

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 7 月 7 日 (07.07.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/061713 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/29, 1/15, 1/19, 1/21, 5/14, 9/02, 9/10, C07K 16/16, C12Q 1/68, A01H 5/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/019196

(22) 国際出願日: 2004 年 12 月 22 日 (22.12.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2003-425673  
2003 年 12 月 22 日 (22.12.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サントリー株式会社 (SUNTORY LIMITED) [JP/JP]; 〒5308203 大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 1 番 4 0 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大山 莞爾 (OHYAMA, Kanji).

(74) 代理人: 原 謙三 (HARA, Kenzo); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋 2 丁目北 2 番 6 号 大和南森町ビル 原謙三国際特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: UNSATURATED FATTY ACID SYNTHASE GENE ORIGINATING IN *MARCHANTIALES* PLANT AND UTILIZATION OF THE SAME

(54) 発明の名称: ゼニゴケ由来の不飽和脂肪酸合成系酵素遺伝子及びその利用

(57) Abstract: From a single species of *Marchantiales*, a  $\Delta 5$  fatty acid desaturase gene, a  $\Delta 6$  fatty acid desaturase gene and a  $\Delta 6$  fatty acid elongase gene are isolated. By transferring these genes into a higher plant, a transformant plant capable of producing arachidonic acid or eicosapentaenoic acid (EPA) can be obtained.

(57) 要約: 同一種のゼニゴケから、 $\Delta 5$  脂肪酸不飽和化酵素遺伝子、 $\Delta 6$  脂肪酸不飽和化酵素遺伝子及び  $\Delta 6$  脂肪酸鎖延長酵素遺伝子を単離する。これらの遺伝子を高等植物に導入することにより、アラキドン酸やエイコサペンタエン酸 (EPA) を生産し得る形質転換植物体を取得する。



WO 2005/061713 A1

## 明 細 書

### ゼニゴケ由来の不飽和脂肪酸合成系酵素遺伝子及びその利用 技術分野

[0001] 本発明は、ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) 由来の不飽和脂肪酸合成系遺伝子、すなわち、 $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化酵素、 $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化酵素、及び  $\Delta 6$ 脂肪酸鎖長延長酵素の遺伝子とその利用に関するものである。

### 背景技術

[0002] アラキドン酸、エイコサペンタエン酸(以下、適宜「EPA」と略記する)等の高度不飽和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acid; PUFA)は、ヒトにおいて神経系を中心とした細胞膜脂質に多く含まれている。これらの高度不飽和脂肪酸は、プロスタグランジンやロイコトリエンといった、生理活性物質の前駆体として作用しており、薬理学的に非常に重要である。近年、アラキドン酸やEPAを含む健康食品も販売されている。また、脂肪酸は、洗剤や生分解性プラスチックの原料にもなるため、素材としても注目されている。

[0003] 高度不飽和脂肪酸は、現在、培養微生物又は魚油からの抽出により生産されている。このため、生産コストが高いこと、エネルギー使用量・廃棄物量が多くなること、特に魚油から調製する方法では、魚資源が限られていることが問題になっている。

[0004] アラキドン酸及びEPAは、それぞれリノール酸及び $\alpha$ -リノレン酸を起点として、 $\Delta 6$ 不飽和化、脂肪酸鎖長延長及び $\Delta 5$ 不飽和化という3つの連続した反応により生合成されると考えられている。これらの反応は、それぞれ、 $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化酵素(以下、「 $\Delta 6$ 不飽和化酵素」と略記する)、 $\Delta 6$ 脂肪酸鎖長延長酵素(以下、「 $\Delta 6$ 鎖長延長酵素」と略記する)及び $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化酵素(以下、「 $\Delta 5$ 不飽和化酵素」と略記する)により触媒される。

[0005]  $\Delta 6$ 不飽和化酵素の遺伝子は、いくつかの植物種でクローン化されている。例えば、ケイ藻、ヒメツリガネゴケ、ヤノウエノアカゴケ、ボリジ、ムラサキ、サクラソウ及びアネモネから $\Delta 6$ 不飽和化酵素の遺伝子がクローン化されている。また、植物以外では、糸状菌、線虫、ラン藻、ラット及びヒトから $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子がクローン化され

ている(非特許文献1:「Eur. J. Biochem. 269, p4105, 2002」、非特許文献2:「Plant J. 15, p39, 1998」、非特許文献3:「Eur. J. Biochem., 267. p3801, 2000」、非特許文献4:「Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, p4211, 1997」、非特許文献5:「Lipids 37, 417, 2002」、非特許文献6:「FEBS Lett. 542, p100, 2003」、非特許文献7:「Whitney et al., Planta Epub 2003」、非特許文献8:「Lipids 34, p649, 1999」、非特許文献9:「Gene, 238, p445 1999」、非特許文献10:「Biochem J. 330, p611 1998」、非特許文献11:「Plant Mol. Biol., 22, p293 1993」、非特許文献12:「Biochem. Biophys. res. Commun. 255, p575, 1999」、非特許文献13:「J. Biol. Chem. 274, p471, 1999」参照)。また、ラン藻のものを除いて、これらの $\Delta 6$ 不飽和化酵素は、いずれもN末端にシトクロムb5ドメインが存在する。

- [0006]  $\Delta 6$ 鎖長延長酵素の遺伝子は、最初に糸状菌及び線虫からクローン化された(非特許文献14:「Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, p8284, 2000」、非特許文献15:「Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, p6421, 2000」参照)。植物種では、唯一ヒメツリガネからクローン化されている(非特許文献16:「Plant J. 31, p255, 2002」参照)。
- [0007] 酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)には、スフィンゴ脂質の長鎖飽和アシル鎖合成に関与するELO2蛋白及びELO3蛋白が存在し(非特許文献17:「J. Biol. Chem., 272, p17376, 1997」参照)、 $\Delta 6$ 鎖長延長酵素のアミノ酸配列は、これらと相同性を示す。一方、植物には、別タイプの脂肪酸鎖長延長酵素である $\beta$ -ケトアシルCoA合成酵素(KCS)が存在する。この酵素は、長鎖飽和／一価不飽和脂肪酸の鎖長延長を触媒する(非特許文献15及び非特許文献18:「Plant Cell 7, p309, 1995」参照)。しかしながら、 $\Delta 6$ 鎖長延長酵素遺伝子及び酵母ELO2／ELO3遺伝子は、KCS遺伝子との直接的な進化上の関係は見られない(非特許文献15及び16参照)。
- [0008]  $\Delta 5$ 不飽和化酵素の遺伝子は、糸状菌から、初めてクローン化された(非特許文献19:「J. Biol. Chem. 273, p29360, 1998」、非特許文献20:「J. Biol. Chem. 273, p19055」参照)。 $\Delta 5$ 不飽和化酵素の構造は $\Delta 6$ 不飽和化酵素と共通しており、N末端にシトクロムb5ドメインを有する。 $\Delta 5$ 不飽和化酵素遺伝子は、ケイ藻、線虫、ラット、ヒト、ヒメツリガネゴケなどからクローン化されている(非特許文献1, 非特許文献21:「FEBS Lett. 439, p215, 1998」、非特許文献22:「Arch. Biochem. Biophys. 391, p8,

2001」、非特許文献23:「J. Biol. Chem. 274, p37335, 1999」、非特許文献24:「J. Biol. Chem. 278, 35115, 2003」参照)。

- [0009] 陸上植物は、コケ植物(コケ植物門(Bryophyta))、シダ植物、裸子植物及び被子植物から構成されている。コケ植物は陸上植物の中で最も古くに分岐した群であり、セン類(セン類綱(Bryosida))、タイ類(タイ類綱(Hepaticopsida))及びツノゴケ類の3つのグループから構成されている。ゼニゴケは、上記生物のうちヒメツリガネゴケに分類上最も近いが、ヒメツリゴケはセン類に属しており、ゼニゴケはタイ類綱の中のゼニゴケ亜綱(Marchantiidae)に属している。上記3つのグループは、約4億3千年前には、すでに分岐していたことは確かである。したがって、同じコケといっても、ヒメツリガネゴケとゼニゴケとは、例えば2億年前に分化したシロイナズナとイネとの違いどころでなく、進化上大きく異なる(非特許文献25:「1103615143968\_0.html」参照)。
- [0010] ゼニゴケ由来の高度不飽和脂肪酸合成系酵素遺伝子としては、上記のKCS様の鎖長延長酵素遺伝子のMpFAE2及びMpFAE3が取得されている(非特許文献26:「Biosci. Biotechnol. Biochem. 67, p605, 2003」、非特許文献27:「Biosci. Biotechnol. Biochem. 67, p1667, 2003」参照)。しかしながら、MpFAE2及びMpFAE3は $\Delta 6$ 鎖長延長酵素遺伝子ではない。
- [0011] 上述のように、多くの高度脂肪酸合成系酵素遺伝子が様々な生物種からクローン化されているが、アラキドン酸、EPA等の、C20以上で不飽和度4以上の高度不飽和脂肪酸を植物中で生産させた例は少ない。このような例として、ケイ藻由来の $\Delta 6$ 不飽和化酵素及び $\Delta 5$ 不飽和化酵素と、ヒメツリガネゴケ由来の $\Delta 6$ 鎖長延長酵素とをアマで発現させ、アラキドン酸及びEPAを生産させた報告があるが、その詳細は不明である(非特許文献24参照)。
- [0012] 上述のように、アラキドン酸やEPA等の高度不飽和脂肪酸の生産は、培養微生物又は魚油からの抽出により生産されているため、生産コストが高いこと、エネルギー使用量・廃棄物量が多くなること、魚資源が限られていること等の問題点を有している。アラキドン酸やEPA等の高度不飽和脂肪酸は、分子内に二重結合を複数有するというユニークな物性を持っているため、様々な工業用途(例えばフィルム、生分解性プラスチック、機能性繊維、潤滑油、洗剤の素材等)にも利用可能となる。このような

高度不飽和脂肪酸を遺伝子組み換え植物により生産することにより、生産コストを低減でき、同時に、より環境にやさしい生産プロセスを実現することができると期待される。遺伝子組み換え技術を用いて、これらの高度不飽和脂肪酸を、油糧植物で大量生産できるようになれば、安価な多目的原料として非常に有用である。

[0013] 一方、植物に異種生物の遺伝子を発現させる場合、その遺伝子が植物内でどの程度良好に機能するかは、転写、翻訳、その後の修飾などの過程があるため、予想することは困難である。特に、複数の異種生物の遺伝子を発現させる場合、上記非特許文献24のように異なる生物種由来の複数の遺伝子を発現させるより、同一の種に由来する複数の遺伝子を発現させるほうが植物内で良好に機能することが予想される。また、最初の陸上植物であるコケ類のゼニゴケは、高等植物のモデル系として注目されており、その遺伝子は植物内で良好に機能することが期待できる。したがって、ゼニゴケ由来の高度不飽和脂肪酸合成酵素遺伝子、すなわち $\Delta 5$ 不飽和化酵素遺伝子、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子及び $\Delta 6$ 鎖長延長酵素遺伝子を取得することができれば、これらの遺伝子を植物に導入することにより、アラキドン酸やEPAが植物内で効率よく蓄積されることが期待できる。

[0014] また、ゼニゴケと同じコケ植物のヒメツリガネゴケからは $\Delta 5$ 不飽和化酵素遺伝子、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子及び $\Delta 6$ 鎖長延長酵素遺伝子がクローン化されているが、ゼニゴケとヒメツリガネゴケは進化上大きく異なっており、ヒメツリガネゴケの遺伝子に基づいてゼニゴケの遺伝子を取得することは、現在の技術水準をもってしても容易にできることではない。

#### 発明の開示

[0015] 本発明は、上記従来の問題点に鑑みなされたものであって、その目的は、高等植物中でアラキドン酸やEPAを生産し得る、ゼニゴケ(*Marchantia polymorpha*)由来の不飽和脂肪酸合成酵素遺伝子、すなわち $\Delta 5$ 不飽和化酵素遺伝子、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子及び $\Delta 6$ 鎖長延長酵素遺伝子、及びその利用法を提供することにある。

[0016] 本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意検討した結果、ゼニゴケ(*Marchantia polymorpha*)由来のcDNAクローンから、上記 $\Delta 6$ 不飽和化酵素、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素及び $\Delta 6$ 鎖長延長酵素をコードする遺伝子を同定し、更にこれらの遺伝

子をメタノール資化性酵母 (*Pichia pastoris*) に導入して発現させることに成功し、これらの遺伝子を発現させたたんぱく質が、それぞれ  $\Delta 6$  不飽和化、 $\Delta 5$  不飽和化及び  $\Delta 6$  鎖長延長の酵素活性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、以下の発明を包含する。

- [0017] (1) 配列番号1に示される塩基配列からなるDNAの全部又は一部、あるいは当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAの全部又は一部とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\Delta 6$  脂肪酸不飽和化活性を有するたんぱく質をコードするゼニゴケ目生物由来の遺伝子。
- [0018] (2)  $\Delta 6$  脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記 (a) 又は (b) に記載の遺伝子。(a) 配列番号1に示される塩基配列を有する遺伝子。(b) 配列番号1に示される塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズする遺伝子。
- [0019] (3)  $\Delta 6$  脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記 (a) 又は (b) に記載の遺伝子。(a) 配列番号1に示される塩基配列のうち、253ないし1698番目の塩基配列を有する遺伝子。(b) 配列番号1に示される塩基配列のうち、253ないし1698番目の塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズする遺伝子。
- [0020] (4)  $\Delta 6$  脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記 (a) 又は (b) に記載の遺伝子。(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。(b) 配列番号2に示されるアミノ酸配列の1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。
- [0021] (5) 配列番号3に示される塩基配列からなるDNAの全部又は一部、あるいは当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAの全部又は一部とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\Delta 6$  脂肪酸鎖長延長活性を有するたんぱく質をコードするゼニゴケ目生物由来の遺伝子。
- [0022] (6)  $\Delta 6$  脂肪酸鎖長延長活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記 (a) 又は (b) に記載の遺伝子。(a) 配列番号3に示される塩基配列を有する

遺伝子。(b)配列番号3に示される塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

[0023] (7)  $\Delta 6$ 脂肪酸鎖長延長活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記(a)又は(b)に記載の遺伝子。(a)配列番号1に示される塩基配列のうち、194ないし1066番目の塩基配列を有する遺伝子。(b)配列番号1に示される塩基配列のうち、194ないし1066番目の塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

[0024] (8)  $\Delta 6$ 脂肪酸鎖長延長活性を有するゼニゴケ目由来のたんぱく質をコードする、下記(a)又は(b)に記載の遺伝子。(a)配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質、(b)配列番号4に示されるアミノ酸配列の1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。

[0025] (9)配列番号5に示される塩基配列からなるDNAの全部又は一部、あるいは当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAの全部又は一部とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化活性を有するたんぱく質をコードするゼニゴケ目生物由来の遺伝子。

[0026] (10)  $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記(a)又は(b)に記載の遺伝子。(a)配列番号5に示される塩基配列を有する遺伝子。(b)配列番号5に示す塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

[0027] (11)  $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記(a)又は(b)に記載の遺伝子。(a)配列番号5に示される塩基配列のうち、375ないし1829番目の塩基配列を有する遺伝子。(b)配列番号5に示される塩基配列のうち、375ないし1829番目の塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

[0028] (12)  $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記(a)又は(b)に記載の遺伝子。(a)配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質、(b)配列番号6に示されるアミノ酸配列の1個又はそれ以上のアミノ

酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。

[0029] (13) 上記(1)～(12)の何れかに記載の遺伝子によってコードされるたんぱく質。

[0030] (14) 以下の(a)又は(b)記載のたんぱく質。(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質。(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、 $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化活性を有するたんぱく質。

[0031] (15) 以下の(a)又は(b)記載のたんぱく質。(a)配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質。(b)配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、 $\Delta 6$ 脂肪酸鎖長延長活性を有するたんぱく質。

[0032] (16) 以下の(a)又は(b)記載のたんぱく質。(a)配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質。(b)配列番号6に示されるアミノ酸配列において、1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、 $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化活性を有するたんぱく質。

[0033] (17) 上記(13)～(16)の何れかに記載のたんぱく質を認識する抗体。

[0034] (18) 少なくとも上記(1)～(12)の何れかに記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。

[0035] (19) 少なくとも上記(1)～(12)の何れかに記載の遺伝子を導入してなる形質転換体。

[0036] (20) 少なくとも上記(1)～(12)の何れかに記載の遺伝子が発現可能に導入された植物体、もしくは当該植物体と同一の性質を有する当該植物体の子孫となる植物体、又は当該植物体の組織。

[0037] (21) 少なくとも上記(1)～(12)の何れかに記載の遺伝子が発現可能に導入され、脂肪酸組成が改変された植物体、もしくは当該植物体と同一の性質を有する当該植物体の子孫となる植物体、又は当該植物体の組織。

[0038] (22) 上記(20)又は(21)に記載の植物体の繁殖材料。

[0039] (23) 上記(21)に記載の植物体又は植物体の組織を用いる脂肪酸生産方法。



- [0040] (24) 上記(23)に記載の脂肪酸生産方法により得られた、 $\gamma$ -リノレン酸、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸、アラキドン酸、ステアリドン酸、エイコサテトラエン酸、およびエイコサペンタエン酸から選択される少なくとも1つ含む素材。
- [0041] (25) 少なくとも(1)〜(12)の何れかに記載の遺伝子を用いて脂肪酸組成を改変する方法。
- [0042] (26) 上記(1)〜(12)の何れかに記載の遺伝子における少なくとも一部の塩基配列又はその相補配列をプローブとして用いた遺伝子検出器具。
- [0043] (27) 上記(13)〜(16)の何れかに記載のたんぱく質を用いて、当該たんぱく質を調節する遺伝子、又は当該たんぱく質を調節する物質をスクリーニングする方法。
- [0044] (28) 上記(27)に記載のスクリーニング方法により得られた遺伝子又は物質。
- [0045] なお、本明細書において、特に断らない限り、A、C、GおよびTは、アデニン、シトシン、グアニンおよびチミンの各塩基を示す。
- [0046] 本発明のさらに他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分わかるであろう。また、本発明の利益は、添付図面を参照した次の説明で明白になるであろう。

#### 図面の簡単な説明

- [0047] [図1]実施例6で用いたMpDES6遺伝子、MpELO1遺伝子及びMpDES5遺伝子の各遺伝子の発現カセットが連結されたコンストラクトの構築手順を示す説明図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

- [0048] 本発明の実施の一形態について説明すれば、以下の通りである。なお、本発明は、これに限定されるものではない。
- [0049] 以下、アラキドン酸及びエイコサペンタエン酸(EPA)の合成経路、本発明に係る遺伝子、本発明に係るたんぱく質、本発明に係るたんぱく質及び遺伝子の取得方法、並びに本発明に係る遺伝子及びたんぱく質の利用方法(有用性)の順で、本発明を詳細に説明する。
- [0050] (1) アラキドン酸及びエイコサペンタエン酸(EPA)の合成経路  
アラキドン酸及びエイコサペンタエン酸(EPA)は、それぞれリノール酸及び $\alpha$ -リノ

レン酸を起点として、 $\Delta 6$ 不飽和化、 $\Delta 6$ 鎖長延長及び $\Delta 5$ 不飽和化という3つの連続した反応により、生合成されると考えられる。これらの反応は、それぞれ $\Delta 6$ 不飽和化酵素、 $\Delta 6$ 鎖長延長酵素及び $\Delta 5$ 不飽和化酵素により触媒され、それぞれ、 $n-6$ 経路(アラキドン酸合成経路)及び $n-3$ 経路(EPA合成経路)と呼ばれている。

[0051] これまでに報告されている $\Delta 6$ 不飽和化酵素、 $\Delta 6$ 鎖長延長酵素及び、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素は、いずれも $n-6$ 及び $n-3$ 経路の両方に関与していることが示されている。すなわち、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素は、 $n-6$ 経路ではリノール酸( $18:2\Delta^{9,12}$ 、18は炭素数を表し、2は二重結合の数を表し、9、12は二重結合の位置を表す。以下同様である。)を $g$ -リノレン酸(GLA;  $18:3\Delta^{6,9,12}$ )に変換し、 $n-3$ 経路では $\alpha$ -リノレン酸(ALA;  $18:3\Delta^{9,12,15}$ )をステアリドン酸(STA;  $18:4\Delta^{6,9,12,15}$ )に変換する。 $\Delta 6$ 鎖長延長酵素は、 $n-6$ 経路ではGLAをジホモ- $\gamma$ -リノレン酸(DGLA;  $20:3\Delta^{8,11,14}$ )に変換し、 $n-3$ 経路ではSTAをエイコサテトラエン酸(ETA;  $20:4\Delta^{8,11,14,17}$ )に変換する。 $\Delta 5$ 不飽和化酵素は、 $n-6$ 経路ではDGLAをアラキドン酸( $20:4\Delta^{5,8,11,14}$ )に、 $n-3$ 経路ではETAをエイコサペンタエン酸(EPA;  $20:5\Delta^{5,8,11,14,17}$ )に変換する。

[0052] (2) 本発明に係る遺伝子

[本発明に係る $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子]

本発明に係る $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子は、 $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化活性を有するたんぱく質をコードするゼニゴケ目生物由来の遺伝子であり、以下の条件に適合する遺伝子であればよい。

[0053] 1. 配列番号1に示される塩基配列を有する遺伝子。

[0054] 2. 配列番号1に示される塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

[0055] 3. 配列番号1に示される塩基配列からなるDNAの一部、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAの一部とストリンジントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

[0056] 4. 配列番号1に示される塩基配列のうち、253ないし1698番目の塩基配列を有する遺伝子。なお、配列番号1に示される塩基配列の253ないし1698番目の塩基配列は配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質に翻訳される領域であ

る。

[0057] 5. 配列番号1に示される塩基配列のうち、253ないし1698番目の塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

[0058] 6. 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。

[0059] 7. 配列番号2に示されるアミノ酸配列の1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。

[0060] [本発明に係る $\Delta$ 6鎖長延長酵素遺伝子]

本発明に係る $\Delta$ 6鎖長延長酵素遺伝子は、 $\Delta$ 6脂肪酸鎖長延長酵素活性を有するたんぱく質をコードするゼニゴケ目生物由来の遺伝子であり、以下の条件に適合する遺伝子であればよい。

[0061] 1. 配列番号3に示される塩基配列を有する遺伝子。

[0062] 2. 配列番号3に示される塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

[0063] 3. 配列番号3に示される塩基配列からなるDNAの一部、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAの一部とストリンジントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

[0064] 4. 配列番号3に示される塩基配列のうち、194ないし1066番目の塩基配列を有する遺伝子。なお、配列番号3に示される塩基配列の194ないし1066番目の塩基配列は配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質に翻訳される領域である。

[0065] 5. 配列番号3に示される塩基配列のうち、194ないし1066番目の塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

[0066] 6. 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。

[0067] 7. 配列番号4に示されるアミノ酸配列の1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。

[0068] [本発明に係る $\Delta$ 5不飽和化酵素遺伝子]

本発明に係る $\Delta 5$ 不飽和化酵素遺伝子は、 $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化活性を有するたんぱく質をコードするゼニゴケ目生物由来の遺伝子であり、以下の条件に適合する遺伝子であればよい。

- [0069] 1. 配列番号5に示される塩基配列を有する遺伝子。
- [0070] 2. 配列番号5に示される塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズする遺伝子。
- [0071] 3. 配列番号5に示される塩基配列からなるDNAの一部、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAの一部とストリンジントな条件でハイブリダイズする遺伝子。
- [0072] 4. 配列番号5に示される塩基配列のうち、375ないし1829番目の塩基配列を有する遺伝子。なお、配列番号5に示される塩基配列の375ないし1829番目の塩基配列は配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質に翻訳される領域である。
- [0073] 5. 配列番号5に示される塩基配列のうち、375ないし1829番目の塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズする遺伝子。
- [0074] 6. 配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。
- [0075] 7. 配列番号6に示されるアミノ酸配列の1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。
- [0076] なお、上記「ストリンジントな条件」とは、少なくとも90%の同一性、好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは少なくとも97%の同一性が配列間に存在するときのみハイブリダイゼーションが起こることを意味する。
- [0077] 上記ハイブリダイゼーションは、J.Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1989)に記載されている方法等、従来公知の方法で行うことができる。通常、温度が高いほど、塩濃度が低いほどストリンジエンシーは高くなり(ハイブリダイズし難くなる)、より相同な遺伝子を取得することができる。ハイブリダイゼーションの条件としては、従来公知の条件を好適に用いることができ、特に限定しないが、例えば、42℃、6×SSPC、50%ホルムアミド、1%SDS

、100  $\mu$ g/ml salmon sperm DNA、5×デンハルト液(ただし、1×SSPE;0.18M 塩化ナトリウム、10mM リン酸ナトリウム、pH7.7、1mM EDTA)が挙げられる。

[0078] 上記「ゼニゴケ目生物」とは、ゼニゴケ(*Marchantia polymorpha*)に限定されるものではなく、ゼニゴケ亜綱ゼニゴケ目(*Marchantiales*)に属する生物が含まれる。これらのうち、*Monoclea forsteri* (*Monocleales*)、*Corsinia coriandrina* (*Marchantiales*)、*Oximitra paleacea* (*Marchantiales*)、*Ricciocarpos natans* (*Marchantiales*)、*Ricca huebeneriana* (*Marchantiales*)、*Ricca fluitans* (*Marchantiales*)、*Ricca duplex* (*Marchantiales*)、*Ricca canaliculata* (*Marchantiales*)、*Ricca bifurca* (*Marchantiales*)、*Ricca ciliifera* (*Marchantiales*)、*Ricca glauca* (*Marchantiales*)、*Ricca sorocarpa* (*Marchantiales*)、*Ricca warnstorffii* (*Marchantiales*)、*Ricca michelii* (*Marchantiales*)、*Ricca papillosa* (*Marchantiales*)及び*Ricca zachariae* (*Marchantiales*)には、超長鎖長高度不飽和脂肪酸が存在することが知られている(Prog. Lipid Res. 32, p281, 1993参照)。これらの生物から $\Delta 6$ 不飽和化酵素、 $\Delta 6$ 鎖長延長酵素及び $\Delta 5$ 不飽和化酵素の遺伝子を取得することは現在の技術水準を持ってすれば容易である。例えば、近縁生物の同じ機能を有する酵素をコードする遺伝子は、クロスハイブリダイゼーションすることが一般に知られている。

[0079] 本発明の遺伝子は、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖及びアンチセンス鎖といった各1本鎖DNAやRNAを包含する。アンチセンス鎖は、プローブとして又はアンチセンス化合物として利用できる。DNAには、例えばクローニングや化学合成技術又はそれらの組み合わせで得られるようなcDNAやゲノムDNAなどが含まれる。さらに、本発明の遺伝子は、非翻訳領域(UTR)の配列やベクター配列(発現ベクター配列を含む)などの配列を含むものであってもよい。

[0080] (3) 本発明に係るたんぱく質

[本発明に係る $\Delta 6$ 不飽和化酵素たんぱく質]

本発明に係る $\Delta 6$ 不飽和化酵素たんぱく質は、ゼニゴケ目生物由来のたんぱく質であって $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化活性を有するたんぱく質であればよい。より具体的には、以下に示すたんぱく質であればよい。

[0081] 1. 上記(2)に記載した本発明に係る $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子によってコードされ

るたんぱく質。

[0082] 2. 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質。

[0083] 3. 配列番号2に示されるアミノ酸配列の1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質。

[0084] [本発明に係る $\Delta$ 6鎖長延長酵素たんぱく質]

本発明に係る $\Delta$ 6鎖長延長酵素たんぱく質は、ゼニゴケ目生物由来のたんぱく質であって $\Delta$ 6脂肪酸鎖長延長活性を有するたんぱく質であればよい。より具体的には、以下に示すたんぱく質であればよい。

[0085] 1. 上記(2)に記載した本発明に係る $\Delta$ 6鎖長延長酵素遺伝子によってコードされるたんぱく質。

[0086] 2. 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質。

[0087] 3. 配列番号4に示されるアミノ酸配列の1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質。

[0088] [本発明に係る $\Delta$ 5不飽和化酵素たんぱく質]

本発明に係る $\Delta$ 5不飽和化酵素たんぱく質は、ゼニゴケ目生物由来のたんぱく質であって $\Delta$ 5脂肪酸不飽和化活性を有するたんぱく質であればよい。より具体的には、以下に示すたんぱく質であればよい。

[0089] 1. 上記(2)に記載した本発明に係る $\Delta$ 5不飽和化酵素遺伝子によってコードされるたんぱく質。

[0090] 2. 配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質。

[0091] 3. 配列番号6に示されるアミノ酸配列の1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質。

[0092] 上記「 $\Delta$ 6脂肪酸不飽和化活性」とは、リノール酸又は $\alpha$ -リノレン酸に対して基質特異性を有し、それぞれ $\gamma$ -リノレン酸又はステアリドン酸に変換する作用を意味する。また、上記「 $\Delta$ 6脂肪酸鎖長延長活性」とは、 $\gamma$ -リノレン酸又はステアリドン酸に対して基質特異性を有し、それぞれジホモ- $\gamma$ -リノレン酸又はエイコサテトラエン酸に変換する作用を意味する。また、上記「 $\Delta$ 5脂肪酸不飽和化活性」とは、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸又はエイコサテトラエン酸に対して基質特異性を有し、それぞれアラキドン酸

又はエイコサペンタエン酸(EPA)に変換する作用を意味する。

[0093] 上記「1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加された」とは、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異たんぱく質作製法により置換、欠失、挿入、及び／又は付加できる程度の数(好ましくは10個以下、より好ましくは7個以下、さらに好ましくは5個以下)のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されることを意味する。このような変異たんぱく質は、公知の変異たんぱく質作製法により人為的に導入された変異を有するたんぱく質に限定されるものではなく、天然に存在する同様の変異たんぱく質を単離精製したものであってもよい。

[0094] なお、本発明のたんぱく質は、アミノ酸がペプチド結合してなるポリペプチドであればよいが、これに限定されるものではなく、ポリペプチド以外の構造を含む複合たんぱく質であってもよい。ここでいうポリペプチド以外の構造としては、糖鎖やイソプレノイド基等を挙げることができるが、特に限定されるものではない。

[0095] また、本発明のたんぱく質は、付加的なポリペプチドを含むものであってもよい。このようなポリペプチドが付加される場合としては、例えば、HisやMyc、Flag等によって本発明のたんぱく質がエピトープ標識されるような場合が挙げられる。

[0096] また、本発明のたんぱく質は、前述した本発明の遺伝子(本発明のたんぱく質をコードする遺伝子)を宿主細胞に導入して、そのたんぱく質を細胞内発現させた状態であってよいし、細胞、組織などから単離精製された状態であってよい。また、上記宿主細胞での発現条件によっては、本発明のたんぱく質は、他のたんぱく質とつながった融合たんぱく質であってよい。さらに本発明のたんぱく質は、化学合成されたものであってもよい。

[0097] (4) 本発明に係るたんぱく質及び遺伝子の取得方法

本発明に係るたんぱく質及び遺伝子の取得方法(生産方法)は特に限定されるものではないが、代表的な方法として次に示す各方法を挙げることができる。

[0098] [たんぱく質の取得方法]

本発明のたんぱく質を取得する方法(生産方法)は、上述したように特に限定されるものではないが、まず、本発明のたんぱく質を発現する細胞、組織などから単純精製する方法を挙げることができる。精製方法も特に限定されるものではなく、公知の方

法で細胞や組織から細胞抽出液を調製し、この細胞抽出液を公知の方法、例えばカラム等を用いて精製すればよい。

[0099] また、本発明のたんぱく質を取得する方法として、遺伝子組み換え技術等を用いる方法も挙げられる。この場合、例えば、本発明の遺伝子をベクターなどに組み込んだ後、公知の方法により発現可能に宿主細胞に導入し、細胞内で翻訳されて得られる上記たんぱく質を精製するという方法などを採用することができる。

[0100] なお、このように宿主に外来遺伝子を導入する場合、外来遺伝子の発現のため宿主内で機能するプロモーターを組み入れた発現ベクター及び宿主には様々なものが存在するので、目的に応じたものを選択すればよい。産生されたたんぱく質を精製する方法は、用いた宿主、たんぱく質の性質によって異なるが、タグの利用等によって比較的容易に目的のたんぱく質を精製することが可能である。

[0101] 変異たんぱく質を作製する方法についても、特に限定されるものではない。例えば、部位特異的突然変異誘発法 (Hashimoto-Gotoh, Gene 152, 271-275 (1995) 他)、PCR法を利用して塩基配列に点変異を導入し変異たんぱく質を作製する方法、あるいはトランスポゾンの挿入による突然変異株作製法などの周知の変異たんぱく質作製法を用いることができる。変異たんぱく質の作製には市販のキットを利用してもよい。

[0102] 本発明のたんぱく質の取得方法は上述の方法限定されることはなく、例えば、化学合成されたものであってもよい。例えば、無細胞系のたんぱく質合成液を利用して本発明の遺伝子から本発明のたんぱく質を合成してもよい。

[0103] [遺伝子の取得方法]

本発明の遺伝子を取得する方法(生産方法)も特に限定されるものではないが、例えば、ディファレンシャルスクリーニング(サブトラクションクローニング)を利用する方法を挙げることができる。この方法では、公知の技術に従って、試験管内での直接的ハイブリダイゼーションを繰り返し、目的のcDNA(本発明の遺伝子)を濃縮すればよい。

[0104] 上記ディファレンシャルスクリーニングにおける各ステップについては、通常用いられる条件の下で行えばよい。これによって得られたクローンは、制限酵素地図の作成及びその塩基配列決定(シーケンシング)によって、さらに詳しく解析することができる。



る。これらの解析によって、本発明の遺伝子配列を含むDNA断片を取得したか容易に確認することができる。

[0105] また、本発明の遺伝子を取得する方法として、公知の技術により、本発明の遺伝子を含むDNA断片を単離し、クローニングする方法が挙げられる。例えば、本発明の遺伝子の塩基配列の一部と特異的にハイブリダイズするプローブを調製し、ゲノムDNAライブラリーやcDNAライブラリーをスクリーニングすればよい。このようなプローブとしては、本発明の遺伝子の塩基配列又はその相補配列の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズするプローブであれば、いずれの配列・長さのものを用いてもよい。

[0106] また、上記プローブの配列を、上述したゼニゴケ間で良好に保存されている領域の中から選択し、他のゼニゴケのゲノムDNA(又はcDNA)ライブラリーをスクリーニングすれば、上記たんぱく質と同様の機能を有する相同分子や類縁分子をコードする遺伝子を単離しクローニングできる。

[0107] あるいは、本発明の遺伝子を取得する方法として、PCR等の増幅手段を用いる方法を挙げることができる。例えば、本発明の遺伝子のcDNA配列のうち、5'側及び3'側の配列(又はその相補配列)の中からそれぞれプライマーを調製し、これらプライマーを用いてゲノムDNA(又はcDNA)等を鋳型にしてPCR等を行い、両プライマー間に挟まれるDNA領域を増幅することで、本発明の遺伝子を含むDNA断片を大量に取得できる。

[0108] (5) 本発明に係る遺伝子及びたんぱく質の利用方法(有用性)

(5-1) 組換え発現ベクター

本発明に係る組換え発現ベクターは、前記(2)に記載した本発明に係る遺伝子を含むものであれば、特に限定されるものではない。例えば、cDNAが挿入された組換え発現ベクターが挙げられる。組換え発現ベクターの作製には、プラスミド、ファージ、又はコスミドなどを用いることができるが特に限定されるものではない。また、作製方法も公知の方法を用いて行えばよい。

[0109] ベクターの具体的な種類は特に限定されるものではなく、宿主細胞中で発現可能なベクターを適宜選択すればよい。すなわち、宿主細胞の種類に応じて、確実に遺

伝子を発現させるために適宜プロモーター配列を選択し、これと本発明の遺伝子を各種プラスミド等に組み込んだものを発現ベクターとして用いればよい。

[0110] 本発明の遺伝子が宿主細胞に導入されたか否か、さらには宿主細胞中で確実に発現しているか否かを確認するために、各種マーカーを用いてもよい。例えば、宿主細胞中で欠失している遺伝子をマーカーとして用い、このマーカーと本発明の遺伝子とを含むプラスミド等を発現ベクターとして宿主細胞に導入する。これによってマーカー遺伝子の発現から本発明の遺伝子の導入を確認することができる。あるいは、本発明のたんぱく質を融合たんぱく質として発現させてもよく、例えば、オワンクラゲ由来の緑色蛍光たんぱく質GFP (Green Fluorescent Protein) をマーカーとして用い、本発明のたんぱく質をGFP融合たんぱく質として発現させてもよい。

[0111] 上記宿主細胞は、特に限定されるものではなく、従来公知の各種細胞を好適に用いることができる。具体的には、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) 等の細菌、酵母 (出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*)、線虫 (*Caenorhabditis elegans*)、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵母細胞等を挙げることができるが、特に限定されるものではない。

[0112] 上記発現ベクターを宿主細胞に導入する方法、すなわち形質転換方法も特に限定されるものではなく、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法等の従来公知の方法を好適に用いることができる。また、例えば、本発明のたんぱく質を昆虫で転移発現させる場合には、バキュロウイルスを用いた発現系を採用することができる。

[0113] (5-2) 形質転換体

本発明に係る形質転換体は、前記(2)に記載した本発明に係る遺伝子導入された形質転換体であれば、特に限定されるものではない。ここで「形質転換体」とは、細胞・組織・器官のみならず、生物個体を含む意味である。

[0114] 形質転換体の作製方法(生産方法)は特に限定されるものではないが、例えば、上述した組換え発現ベクターを宿主細胞に導入して形質転換する方法を挙げることができる。また、形質転換の対象となる生物も特に限定されるものではなく、上記宿主細胞で例示した各種微生物や動物を挙げることができる。

- [0115] 本発明に係る形質転換体は、本発明に係る遺伝子が発現可能に導入された植物体、もしくは当該植物体と同一の性質を有する当該植物体の子孫となる植物体、又は当該植物体の組織の組織であることが好ましい。このような形質転換植物により、低コストかつ環境にやさしい生産プロセスでアラキドン酸やEPA等の高度不飽和脂肪酸を生産することができる。
- [0116] ここで「遺伝子が発現可能に導入された」とは、公知の遺伝子工学的手法(遺伝子操作技術)により、対象細胞(宿主細胞)内に発現可能に導入されることを意味する。
- [0117] 植物体の形質転換に用いられる組換え発現ベクターは、当該植物細胞内で挿入遺伝子を発現させることが可能なものであれば特に限定しない。例えば、植物細胞内で恒常的に遺伝子を発現させるプロモーター(例えば、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター)を有するベクターや、外的な刺激により誘導的に活性化されるプロモーターを有するベクターを用いることができる。なお、この植物細胞には、種々の形態の植物細胞、例えば、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉の切片、カルスなどが含まれる。
- [0118] 植物細胞への組み換え発現ベクターの導入には、ポリエチレングリコール法、電気穿孔法(エレクトロポレーション法)、アグロバクテリウムを介する方法、パーティクルガン法など、当業者に公知の種々の方法を用いることができる。形質転換細胞から植物体の再生は、植物細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である。
- [0119] 例えば、タバコにおいて形質転換植物体を作成する手法については、形質転換したアグロバクテリウムをタバコリーフディスクに感染させる方法、ポリエチレングリコールを用いてプロトプラストへ遺伝子を導入し植物体に再生させる方法、電気パルスによりプロトプラストへ遺伝子導入し植物体を再生させる方法、パーティクルガン法により細胞へ遺伝子を直接導入し植物体を再生させる方法など、いくつかの技術が既に確立されている。本発明においては、これらの方法を好適に用いることができる。
- [0120] また、タバコは、シロイヌナズナと並んで遺伝子工学的手法を用いる植物育種のモデル植物である。このタバコにおいて、アラキドン酸やEPAの含量が増加した形質転換体を取得できるということは、植物全般において形質転換体を取得することができる

るといっても過言ではない。なお、本明細書では、後述する実施例に示すように、タバコだけでなく、イネの形質転換体をも取得しており、本発明によれば、あらゆる種類の形質転換植物体を取得できることを実証している。

[0121] 例えば、イネにおいて形質転換植物体を作成する手法については、ポリエチレングリコールを用いてプロトプラストへ遺伝子を導入し、植物体に再生させる方法、電気パルスによりプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体を再生させる方法、パーティクルガン法により細胞へ遺伝子を直接導入し、植物体を再生させる方法など、いくつかの技術が既に確立されている。本発明においては、これらの方法を好適に用いることができる。

[0122] 上記形質転換植物体がイネである場合、イネ内のアラキドン酸やEPAの含量が増加するので、この形質転換植物体から得られる種子、すなわち、米を食べることで、容易にアラキドン酸やEPA等の高度不飽和脂肪酸を、体内に摂取することが可能になる。したがって、イネの形質転換植物体は、食糧としての価値が高く、食品産業、農業分野に極めて有用である。また、現在あまり利用されていない米ぬか、モミガラ、ヒコバエ等でアラキドン酸やEPAを生産すれば、ここからこれら脂肪酸を抽出することにより、健康食品の原料として有効利用できる。また、家畜の飼料としても利用できる。

[0123] ゲノム内に本発明の遺伝子が導入された形質転換植物体がいったん得られれば、当該植物体から有性生殖又は無性生殖により子孫を得ることができる。また、当該植物体、又は、その子孫、あるいは、クローンから、繁殖材料(例えば、種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラストなど)を得て、それらを基に当該植物体を量産することも可能である。したがって、本発明には、本発明の遺伝子が発現可能に導入された植物体、もしくは、当該植物体と同一の性質を有する当該植物体の子孫となる植物体、又は、当該植物体の組織、あるいは、当該植物体の繁殖材料も含まれる。

[0124] また、当該植物体、当該植物体と同一の性質を有する当該植物体の子孫となる植物体、及び、当該植物体の組織には、栄養増殖された植物体も含まれる。栄養増殖は、栄養生殖、クローン成長とも呼ばれ、挿し芽、挿し木などによる増殖が一般的で

あり、試験管内では、葉、茎、根などの器官からの植物体の再分化やカルスによる増殖が可能である。植物種によっては、枝の先端が特殊な冬芽を作る、腋芽が多肉化する、花がムカゴ化する、芋を形成するなどの場合がある。

[0125] さらに、本発明に係る遺伝子が発現可能に導入され、脂肪酸組成が改変された植物体、もしくは当該植物体と同一の性質を有する当該植物体の子孫となる植物体、又は当該植物体の組織、当該植物体の繁殖材料も本発明に含まれる。「脂肪酸組成が改変された」とは形質転換前の植物体における脂肪酸組成と形質転換後における植物体の脂肪酸組成が異なっていることを意味する。例えば、本来脂肪酸組成にアラキドン酸やEPAが含まれていなかった植物を本発明に係る遺伝子で形質転換することにより、形質転換植物の脂肪酸組成にアラキドン酸やEPAが含まれる場合等を挙げることができる。

[0126] (5-3)脂肪酸生産方法

本発明には、本発明に係る遺伝子で形質転換され、脂肪酸組成が改変された植物体又は植物体の組織を用いて脂肪酸を生産する方法が含まれる。

[0127] 例えば、上述のようにアラキドン酸やEPAの含量が増加した本発明に係る形質転換植物から製造された食用油はアラキドン酸やEPAの含量が高く、価値の高いものになる。上記形質転換植物体の種子、果実、切穂、塊茎、塊根等も、アラキドン酸やEPAを含む食料として価値の高いものになる。

[0128] (5-4)素材

本発明には、上述の脂肪酸生産方法により得られた物質、すなわち、 $\gamma$ -リノレン酸、ジホモ $\gamma$ -リノレン酸、アラキドン酸、ステアリドン酸、エイコサテトラエン酸、エイコサペンタエン酸を少なくとも1つ含む素材も含まれる。この「素材」とは、上述の食料としての種子、果実、切穂、塊茎、又は、塊根の他に、工業原料用途に利用できる素材全般を意味する。

[0129] 上記素材としては、例えば、アラキドン酸やEPAを含む健康食品、フィルム、生分解性プラスチック、機能性繊維、潤滑油、洗剤の素材等が挙げられる。上記の不飽和脂肪酸は、分子内に二重結合を複数有するという、ユニークな物性を持つ。このため、例えば、本発明の形質転換植物体により、アラキドン酸やEPAを生産させること

により、生産コストを低減できる。また、本発明により、環境にやさしい生産プロセスを実現できる。

[0130] (5-5) 脂肪酸組成改変方法

本発明には、本発明に係る遺伝子を用いて脂肪酸組成を改変する方法が含まれる。例えば、上述のように本発明に係る遺伝子を導入した形質転換体を作製することにより宿主細胞の脂肪酸組成を改変することが可能となる。脂肪酸組成を改変する対象は特に限定されるものではなく、植物以外にも動物、細菌、酵母等、あらゆる生物を対象とすることが可能である。

[0131] (5-6) 遺伝子検出器具

本発明に係る遺伝子検出器具は、本発明に係る遺伝子の少なくとも一部の塩基配列又はその相補配列をプローブとして用いたものである。遺伝子検出器具は、種々の条件下において、本発明の遺伝子の発現パターンの検出・測定などに利用することができる。

[0132] 本発明の遺伝子検出器具としては、例えば、本発明の遺伝子と特異的にハイブリダイズする上記プローブを基盤(担体)上に固定化したDNAチップが挙げられる。ここで「DNAチップ」とは、主として、合成したオリゴヌクレオチドをプローブに用いる合成型DNAチップを意味するが、PCR産物などのcDNAをプローブに用いる貼り付け型DNAマイクロアレイをも包含するものとする。

[0133] プローブとして用いる配列は、cDNA配列の中から特徴的な配列を特定する従来公知の方法によって決定することができる。具体的には、例えば、SAGE: Serial Analysis of Gene Expression法 (Science 276:1268, 1997; Cell 88:243, 1997; Science 270:484, 1995; Nature 389:300, 1997; 米国特許第5,695,937号)等を挙げることができる。

[0134] なお、DNAチップの製造には、公知の方法を採用すればよい。例えば、オリゴヌクレオチドとして合成オリゴヌクレオチドを使用する場合には、フォトリソグラフィ技術と固相法DNA合成技術との組み合わせにより、基盤上で該オリゴヌクレオチドを合成すればよい。一方、オリゴヌクレオチドとしてcDNAを用いる場合には、アレイ機を用いて基盤上に貼り付ければよい。

[0135] また、一般的なDNAチップと同様、パーフェクトマッチプローブ(オリゴヌクレオチド)と、該パーフェクトマッチプローブにおいて一塩基置換されたミスマッチプローブとを配置して遺伝子の検出精度をより向上させてもよい。さらに、異なる遺伝子を並行して検出するために、複数種のオリゴヌクレオチドを同一の基盤上に固定してDNAチップを構成してもよい。

[0136] 本発明に係る遺伝子検出器具は、上記例示したDNAチップに限定されるものではなく、本発明に係る遺伝子の少なくとも一部の塩基配列又はその相補配列をプローブとして用いたものであればよい。

[0137] (5-7)抗体

本発明に係る抗体は、本発明に係るたんぱく質、又はその部分たんぱく質・部分ペプチドを抗原として、公知の方法によりポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体として得られる抗体である。公知の方法としては、例えば、文献(Harlowらの「Antibodies : A laboratory manual(Cold Spring Harbor Laboratory, New York(1988))、岩崎らの「単クローン抗体 ハイブリドーマとELISA,講談社(1991)」)に記載の方法が挙げられる。このようにして得られる抗体は、本発明のたんぱく質の検出・測定などに利用できる。

[0138] (5-8)スクリーニング方法

本発明に係るスクリーニング方法は、本発明に係るたんぱく質を用いて、当該たんぱく質を調節する遺伝子、又は当該たんぱく質を調節する物質をスクリーニングする方法である。本発明のスクリーニング方法としては、物質間の結合の有無や解離の有無を調べる従来公知の種々の方法を適用することができ、特に限定されるものではない。例えば、本発明に係るたんぱく質の活性( $\Delta 6$ 不飽和化活性、 $\Delta 6$ 鎖長延長活性及び／又は $\Delta 5$ 不飽和化活性)を促進するような物質のスクリーニングを挙げることができる。

[0139] また、本発明には、上記スクリーニング方法により得られた遺伝子又は物質も含まれる。

[0140] 以下、実施例を示し、本発明についてさらに詳しく説明するが、もちろん、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることはいうまでもない。さらに、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく

、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

[0141] 〔実施例〕

本実施例において、実験手法は、特に断らない限り、Molecular Cloning(Sambrook et.al. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989)に記載されている方法に従った。

[0142] 〔実施例1:ゼニゴケ由来の $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子の単離〕

これまでにクローニングされた $\Delta 6$ 不飽和化酵素のアミノ酸配列の比較により、アミノ酸配列Trp-Trp-Lys-(Glu/Asp)-Lys-His-Asn(配列番号37)及びTrp-Phe-Thr-Gly-Gly-Leu-Asn(配列番号38)が保存されていることがわかった。そこで、ゼニゴケ由来の $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子を単離するために、上記のアミノ酸配列をコードする下記の縮退プライマーを用いた。

dD6DES-F 5'-TGGTGGAA(A/G)GA(A/G/T/C)AA(A/G)CA(T/C)AA-3' (配列番号7)

dD6DES-R 5'-(A/G)TTIA(A/G)ICCCICIGT(A/G)AACCA-3' (配列番号8)

(Iはイノシン、()内は複数の塩基)

[0143] 試料にはE系統ゼニゴケ(Transgenic Res. 9, p179, 2000参照)の葉状体を用いた。葉状体からのpoly(A)<sup>+</sup> RNAの単離については、文献(Biosci. Biotechnol. Biochem. 67, p605, 2003; Biosci. Biotechnol. Biochem. 67, p1667, 2003)に記載の方法に従った。単離したpoly(A)<sup>+</sup>RNA 1.5  $\mu$ lを、Ready-To-Go T-primed First Strand kit (Amersham社製)を用いてcDNAに逆転写した。PCRは、上記cDNA約10ngを鋳型とし、上記プライマー(dD6DES-F及びdD6DES-R)及び酵素(Takara Ex Taq、Takara社製)0.5Uとを用いて、製造者の推奨する方法で行った。反応液量は20  $\mu$ lとし、GeneAmp PCR system 9700(PE Applied Biosystems社製)を用いて、94℃2分間保持後、94℃で1分間、45℃で1.5分間、72℃で2分間の反応を35回繰り返し、その後4℃に冷却した。

[0144] 得られたPCR産物を1%(w/v)アガロ-スゲルで電気泳動し、従来の $\Delta 6$ 不飽和化酵素のアミノ酸配列から予想されるサイズを有する増幅断片を、Prep-A Gene (Bio-rad



社製)を用いてゲルより回収した。回収した増幅断片をpT7Blue Vector (Takara社製)に連結し、大腸菌Electro-max DH10B cells (Invitrogen社製, Carlsbad, CA) に形質転換した。

[0145] BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems社製) 及びautomated sequencer ABI PRISM 377 (Applied Biosystems社製)を用いて得られた全クローンの塩基配列を決定し、目的のcDNA配列をもつものを探索した。

[0146] さらに、全長cDNA配列を取得するために、5'-RACE及び3'-RACEを行った。これには、5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends Version 2.0 (Invitrogen社製)、Ready-To-Go T-primed First Strand kit (Amersham社製) 及び下記のプライマー (MpDES6-02R及びMpDES6-01F)を用い、製造者の推奨する方法で行った。

MpDES6-02R: 5'-AAGTTGCCTTCGATGTTTCTGG-3' (配列番号9)

MpDES6-01F: 5'-GCTCGCCTGGAGCAAGGAAATC-3' (配列番号10)

[0147] その結果、1種類のホモログ遺伝子候補が単離され、この遺伝子をMpDES6遺伝子とした。単離されたMpDES6遺伝子のcDNAの長さ(ポリA部分を除く)は、2, 522bpであり、そのコードする推定アミノ酸配列は481残基であった。その塩基配列を配列番号1、アミノ酸配列を配列番号2に示した。

[0148] MpDES6cDNAの推定アミノ酸配列をヒメツリガネゴケの $\Delta 6$ 不飽和化酵素のアミノ酸配列と比較した結果、47.5%の同一性しか示さなかった。

[0149] [実施例2:ゼニゴケ由来の $\Delta 6$ 鎖長延長酵素遺伝子の単離]

これまでにクローニングされた $\Delta 6$ 鎖長延長酵素のアミノ酸配列の比較により、アミノ酸配列Val-Glu-Phe-Met-Asp-Thr-Val (配列番号39) 及び Lys-Tyr-Leu-Phe-Trp-Gly-Arg (配列番号40) が保存されていることがわかった。そこで、ゼニゴケ由来の $\Delta 6$ 鎖長延長酵素遺伝子を単離するために、上記のアミノ酸配列をコードする下記の縮退プライマーを用いた。

dD6ELO-F 5'-GTIGA(A/G)TT(T/C)ATGGA(T/C)ACIGT-3' (配列番号11)

dD6ELO-R 5'-C(G/T)ICCCCA(A/G)AAIA(A/G)(A/G)TA(T/C)TT-3' (配列番号

12)

- [0150] 上記のプライマー (dD6ELO-F及びdD6ELO-R)を用いてPCRを行い、得られたDNA断片をサブクローニングした。得られたクローンの塩基配列を決定し、目的のcDNA配列をもつクローンについて下記のプライマー (MpELO1-02R及びMpELO1-01F)を用いて完全長cDNAを取得した。なお、実験材料及び方法は、実施例1と同様である。

MpELO1-02R: 5'-GCGAGCTTTCTCGTTCTTTCCC-3' (配列番号13)

MpELO1-01F: 5'-TATGATTTTGAAGCGCAACACG-3' (配列番号14)

- [0151] その結果、1種類のホモログ遺伝子候補が単離され、この遺伝子をMpELO1遺伝子とした。MpELO1遺伝子のcDNAの長さ(ポリA部分を除く)は、1,559bpで、推定アミノ酸配列は290残基であった。その塩基配列を配列番号3、アミノ酸配列を配列番号4に示した。

- [0152] MpELO1cDNAの推定アミノ酸配列をヒメツリガネゴケの $\Delta$ 6鎖延長酵素のアミノ酸配列と比較した結果、同一性は62.7%であった。

- [0153] [実施例3:ゼニゴケ由来の $\Delta$ 5不飽和化酵素遺伝子の単離]

他生物種の $\Delta$ 5不飽和化酵素は、そのN末端にシトクロムb5ドメインを有する。このことから、ゼニゴケ由来の $\Delta$ 5不飽和化酵素遺伝子は、 $\Delta$ 6不飽和化酵素遺伝子と同じく、シトクロムb5ドメイン融合型不飽和化酵素遺伝子ファミリーに属することが予想された。しかしながら、ケイ藻や真菌においては、 $\Delta$ 5不飽和化酵素及び $\Delta$ 6不飽和化酵素間のアミノ酸配列レベルでの相同性は非常に低い。そこで、糸状菌 (*M. alpina*) の $\Delta$ 5不飽和化酵素及び $\Delta$ 6不飽和化酵素間のアミノ酸配列を比較した結果、縮退プライマー設計に最低限必要な4から5残基程度の連続した保存配列が局所的に存在することを見出した。驚くべきことに、これらの保存配列は、異種の $\Delta$ 5不飽和化酵素のアミノ酸配列間より、同種内の $\Delta$ 5不飽和化酵素と $\Delta$ 6不飽和化酵素との間で、より保存されていることを見出した。このことから、シトクロムb5ドメイン融合型不飽和化酵素遺伝子には、種特異的な保存配列が存在する場合があると考えられた。そこで、上述のMpDES6と、Genetics 159, p981, 2001に記載されている機能未知のMpDESとで、塩基配列を鋭意比較検討した結果、2箇所のアミノ酸配列(

I(E/N)(G/D)KVYDV (配列番号41)、及び、DPDI(Q/D)(Y/T)(M/V)P (配列番号42) のアミノ酸配列が保存されていることを見出した。それぞれのアミノ酸配列に対応する縮退プライマーの配列を次に示す。

dD5DES-F 5'-AT(A/T/C)(A/G)AIG(A/G)IAA(A/G)TITA(T/C)GA(T/C)GT-3'  
(配列番号15)

dD5DES-R 5'-GGIA(T/C)I(G/T)(A/T)IT(G/C)(A/G/T)AT(A/G)TCIGG(A/G)TC-3'  
(配列番号16)

- [0154] 上記プライマー (dD5DES-F及びdD5DES-R)を用いてPCRを行い、得られたDNA断片をサブクローニングした。得られたクローンの塩基配列を決定し、目的のcDNA配列をもつクローンについて下記のプライマー (MpDES5-02R及びMpDES5-01F)を用いて完全長cDNAを取得した。なお、実験材料及び方法は、実施例1と同様である。

MpDES5-02R: 5'-GTGTGTACGATCCGTGGTTACC-3' (配列番号17)

MpDES5-01F: 5'-AAGGCGGGACAGGATTCAACAC-3' (配列番号18)

- [0155] その結果、ゼニゴケ由来の $\Delta$ 5不飽和化酵素の候補として、2種類の長さの異なるクローンc1及びc2を単離した(c1:2, 427bp、c2:2, 285bp)。c1とc2との塩基配列を比較したところ、5'非翻訳領域で、オルタナティブ・スプライシング (選択的スプライシング) が起こっていることが明らかとなった。オルタナティブ・スプライシングによる読み枠の変化はなく、いずれのクローンも484個のアミノ酸をコードしていた (配列番号6)。以下、2, 427bpの長さのクローンc1をMpDES5遺伝子 (配列番号5)とし、以下の実施例に用いた。

- [0156] MpDES5cDNAの推定アミノ酸配列を糸状菌 (*M. alpina*) の $\Delta$ 5不飽和化酵素のアミノ酸配列と比較した結果、31.4%の同一性であった。ゼニゴケと近縁なヒメツリガネゴケの $\Delta$ 5不飽和化酵素に関しては、配列情報が公表されていないため、ここでは比較を行わなかった。

- [0157] [実施例4:メタノール資化性酵母 (*Pichia pastoris*)を用いた機能解析]

MpDES6、MpELO1及びMpDES5のcDNAの機能を調べるために、まず個々

のORFを、メタノール誘導性プロモーターAOX1の下流に配置したコンストラクトを作製した。これらのコンストラクトをメタノール資化性酵母 (*Pichia pastoris*) に導入し、その脂肪酸組成を解析した。MpDES6、MpELO1、及び、MpDES5のcDNA塩基配列のORF部分を、下記のプライマーを用いて、PCRにより増幅した。

(MpDES6ORF増幅用プライマー)

MpD6-17F: 5' -GGAATTCGCGATGGCCTCGTCCACCACCAC-3' (配列番号19)

MpD6-18F: 5' -GGAATTCTACTTTTCGCAGCGTATGCTACC-3' (配列番号20)  
(MpELO1ORF増幅用プライマー)

MpD6ELO1-15F: 5' -GGAATTCGCGATGGAGGCGTACGAGATGG-3' (配列番号21)

MpD6ELO1-16F: 5' -GGAATTCTTCTGCCTTTTTTGCTCTTGATC-3' (配列番号22)

(MpDES5ORF増幅用プライマー)

MpD5-11F: 5' -GTTGAATTCGACAGTTATGCCGCCACACGC-3' (配列番号23)

MpD5-12R: 5' -GTTGAATTCAGGCCCAAAGCATGCTGTCAC-3' (配列番号24)

[0158] これらのプライマーは、下線で示したEcoRI認識配列を含んでおり、これを以下のクローニングに利用した。また、PCRにはPyrobest DNA polymerase (Takara社製) 0.5 Uを用い、製造者の推奨する方法に従って反応液量20  $\mu$  lで行った。反応条件は、94°Cで2分間保持後、94°Cで1分間、57°Cで1分間、72°Cで1分間の反応を25回繰り返し、その後4°Cに冷却した。得られた各ORF断片をEcoRIで消化した後、実施例1に記載の方法でゲル精製を行った。そして、メタノール資化性酵母の発現ベクターpPICZA (マーカー:ゼオシン耐性遺伝子, Invitrogen社製) 内のメタノール誘導性プロモーター5' AOX1下流のEcoRI部位にセンス方向に連結した。

[0159] 各々の発現コンストラクト及び対照としてのpPICZAベクターを、*Pichia EasyComp kit* (Invitrogen社製)を用いてメタノール資化性酵母のPPY1系統に導入し、ゼオシン耐

性をマーカーとして形質転換体を取得した。なお、メタノール資化性酵母は、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素の基質であるリノール酸と $\alpha$ -リノレン酸を合成することができるが、アラキドン酸やEPAのその他の前駆体を合成することはできない。

- [0160] 導入した遺伝子を発現させるため、EasySelect Pichia Expression Kit (Invitrogen社製)を用い、当該キットの推奨する方法に従って、各形質転換体を1.0%グリセロールのみを炭素源とする最小培地中でOD(600nm)が0.5になるまで培養した後、0.5%メタノールのみを炭素源とする最小培地中で30℃、3日間、飽和状態になるまで培養した。その後、各々の形質転換体の脂肪酸組成を、GC-MSを用いて公知の方法(Biosci. Biotechnol. Biochem. 67, p605, 2003)により測定した。
- [0161] MpDES6遺伝子を発現させた形質転換体では、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素の反応産物であるg-リノレン酸及びステアリドン酸が、全脂肪酸のそれぞれ7.4%及び0.7%新たに検出された。対照としてpPICZAベクターを導入した酵母ではこれらは検出されなかった。以上のことから、MpDES6は $\Delta 6$ 不飽和化酵素をコードしていることが示された。
- [0162] MpELO1遺伝子を発現させた形質転換体では、g-リノレン酸を添加した場合にジホモ-g-リノレン酸が全脂肪酸の14.1%、ステアリドン酸を添加した場合にエイコサテトラエン酸が1.5%新たに検出された。対照としてpPICZAベクターを導入した酵母では、これらは検出されなかった。以上のことから、MpELO1は $\Delta 6$ 鎖長延長酵素をコードしていることが示された。
- [0163] MpDES5遺伝子を発現させた形質転換体では、ジホモ-g-リノレン酸を添加した場合にアラキドン酸が全脂肪酸の1.1%、ステアリドン酸を添加した場合にエイコサペンタエン酸(EPA)が0.1%検出された。対照としてpPICZAベクターを導入した酵母ではこれらは検出されなかった。以上から、MpDES5は、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素をコードすることが示された。
- [0164] 以上のようにゼニゴケから、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素、 $\Delta 6$ 鎖長延長酵素及び $\Delta 5$ 不飽和化酵素をコードする遺伝子として、それぞれMpDES6、MpELO1及びMpDES5を取得することができた。
- [0165] [実施例5:メタノール資化性酵母(P. pastoris)におけるゼニゴケ高度不飽和脂肪酸

生合成系の再構成]

MpDES6、MpELO1及びMpDES5を共発現させるために、上記実施例4で作製した、EcoRI消化したMpELO1及びMpDES5のORF増幅断片を、各々別のメタノール資化性酵母発現ベクター pPIC3K(マーカー: HIS4遺伝子、Invitrogen社製社) 及びpPIC6A(マーカー: ブラスチジン耐性遺伝子、Invitrogen社製社)の5' AOX1プロモーター下流のEcoRI部位にセンス方向に連結した。また、MpDES6に関しては、実施例4で作製した発現ベクターを用いた。以下各発現ベクターを、それぞれ pPICZA-MpDES6、pPIC3K-MpELO1及びpPIC6A-MpDES5と表記する。

[0166] まず、pPICZA-MpDES6、又は、対照としてのpPICZAベクターのみを、上記実施例4で用いたメタノール資化性酵母PPY1系統と同じ脂肪酸組成を持つメタノール資化性酵母PPY12系統(his4,arg4)に形質転換し、ゼオシン耐性をマーカーにして形質転換体を取得した。続いて、pPIC3K-MpELO1、又は、対照としてのpPIC3Kベクターのみを、それぞれ、pPICZA-MpDES6、又はpPICZAのみがゲノム中に組み込まれた形質転換体に導入し、ヒスチジン合成能をマーカーにして形質転換体を取得した。最後に、pPIC6A-MpDES5、又は、対照としてのpPIC6Aベクターのみを、pPICZA-MpDES6及びpPIC3K-MpELO1又はpPICZA及びpPIC3Kがゲノム中に組み込まれた上記形質転換体に導入し、ブラストジン耐性をマーカーとして形質転換体を取得した。

[0167] 得られた2種類又は3種類の遺伝子が導入された形質転換体を用いて、ゼニゴケのアラキドン酸/EPA生合成系の再構成実験を行った。まず、上記2種類の遺伝子(MpDES6及びMpELO1)を導入した。形質転換体を用いて、MpDES6たんぱく質及びMpELO1たんぱく質をメタノール資化性酵母内で共発現させた。その結果、 $\Delta 6$ 不飽和化反応産物であるg-リノレン酸(全脂肪酸の2.9%)及びステアリドン酸(全脂肪酸の0.4%)に加え、それらの鎖長延長反応産物であるジホモ-g-リノレン酸(全脂肪酸の2.8%)及びエイコサテトラエン酸(全脂肪酸の0.2%)が生じた。対照とした形質転換体では、これらの脂肪酸は検出されなかった。上記形質転換体に、さらにMpDES5を導入した形質転換体では、g-リノレン酸(全脂肪酸の2.8%)、ステアリドン酸(全脂肪酸の0.5%)、ジホモ-g-リノレン酸(全脂肪酸の1.5%)及びエイコサテトラエン

酸(全脂肪酸の0.1%)の4種の脂肪酸に加えて、アラキドン酸(全脂肪酸の0.1%)及びエイコサペンタエン酸(EPA、全脂肪酸の0.03%)の生成が認められた。対照とした形質転換体では、これらの脂肪酸は検出されなかった。この結果から、ゼニゴケ由来の $\Delta 6$ 不飽和化酵素、 $\Delta 6$ 鎖長延長酵素及び $\Delta 5$ 不飽和化酵素の遺伝子を発現させることで、ゼニゴケ以外の生物種においても、高度不飽和脂肪酸生合成系の再構築が可能であることが示された。

[0168] [実施例6:イネに導入するベクターの構築及び当該ベクターのイネへの導入]

イネにおいて、MpDES6、MpELO1及びMpDES5遺伝子を発現させるために、以下の(i)〜(iv)に示す手順で発現コンストラクトを作製した。また、作製手順を図1に示した。

[0169] (i)pBI221 (TOYOBO社製)のカリフラワ-モザイクウイルス(CaMV) 35Sプロモーター、及び、NOSターミネーター間に設計した以下のプライマーを用いたPCRにより、 $\beta$ -Glucuronidase (GUS) 遺伝子部分を除いた発現ベクターp35S-NOSを作製した。

MK001(F): 5' - CGGGATCCTCTCCTGGCGCACCATCGTC-3' (配列番号25)

MK002(R): 5' -GGGGTACCAACGCGCTTTCCCACCAACG-3' (配列番号26)

[0170] なお、プライマーMK001(F)は下線で示すBamHI認識配列を含み、GUS遺伝子の3'末端にアニールし、プライマーMK002(R)はGUS遺伝子の5'末端にアニールする(BamHIサイトがアニール部位の上流に存在する)。PCRにはPyrobest DNA polymerase (Takara社製) 0.5Uを用い、製造者の推奨する方法に従って反応液量50  $\mu$ lで行った。反応条件は、96°C 5分間保持後、94°Cで30秒間、68°Cで4分間の反応を30回繰り返し、その後4°Cに冷却した。得られた各ORF断片をBamHI消化した後、実施例1に記載の方法でゲル精製を行った後、自己連結させた。

[0171] (ii)次にp35S-NOSのXbaIサイトに、MpDES6遺伝子、MpELO1遺伝子及びMpDES5遺伝子のORFを各々連結した。ORF増幅には、下線で示すXbaI認識配列を含む以下のプライマーを用いた。

(MpDES6 ORF増幅用プライマー)

MpD6-21F: 5' -GCTCTAGAGCGATGGCCTCGTCCACCACC-3' (配列番号27)

MpD6-11R: 5' -GCTCTAGACTATACTTTTCGCAGCGTATGC-3' (配列番号28)

(MpELO1 ORF増幅用プライマー)

MpD6ELO1-18F: 5'-GCTCTAGAGCGATGGAGGCGTACGAGATGG-3' (配列番号29)

MpD6ELO1-13R: 5'-GCTCTAGATTATTCTGCCTTTTTGCTC-3' (配列番号30)

(MpDES5 ORF増幅用プライマー)

MpD5-22F: 5'-GCTCTAGAGACAGTTATGCCGCCACACGC-3' (配列番号31)

MpD5-23R: 5'-GCTCTAGAAGGCCCAAAGCATGCTGTCAC-3' (配列番号32)

[0172] PCRにはPyrobest DNA polymerase (Takara社製) 0.5Uを用い、製造者の推奨する方法に従って、反応液量20  $\mu$  lで行った。反応条件は、94°Cで2分間保持後、94°Cで1分間、57°Cで1分間、72°Cで1分間の反応を25回繰り返し、その後4°Cに冷却した。得られた各ORF断片をXbaIで消化した後、実施例1に記載の方法でゲル精製を行いクローニングに用いた。

[0173] (iii)得られた各遺伝子の発現コンストラクト(それぞれをp35S-MpDES6、p35S-MpELO1、p35S-MpDES5と表記する)がいずれもCaMV35Sプロモーター5'末端にPstIサイトを、NOSターミネーター3'末端にEcoRIサイトを持つことを利用して、上記3遺伝子の発現カセットを連結した。まず、以下に示すプライマーを用いてp35S-MpDES5を鋳型としてPCRを行い、MpDES5遺伝子の発現カセット部分を増幅し、p35S-MpDES6のCaMV35Sプロモーター5'末端にあるPstIサイトにクローニングした(図1参照)。

(MpDES5 遺伝子発現カセット増幅用プライマー)

M13R: 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3' (配列番号33)

NOS-R4-PST: 5'-AAACTGCAGATTCCCGATCTAGTAACATAG-3' (配列番号34)

[0174] なお、M13Rプライマーは、CaMV35Sプロモーター上流のベクター配列にアニールする。また、NOS-R4-PSTプライマーは、下線で示すPstI認識配列を含み、NOSターミネーター3'末端にアニールする。同じくNOSターミネーター3'末端に存在するEcoRIサイトは含まない。



- [0175] PCRにはPyrobest DNA polymerase (Takara社製) 0.5Uを用い、製造者の推奨する方法に従って、反応液量20  $\mu$  lで行った。反応条件は、94°Cで2分間保持後、94°Cで1分間、57°Cで1分間、72°Cで1分間の反応を25回繰り返し、その後4°Cに冷却した。得られたDNA断片をPstIで消化した後、実施例1に記載の方法でゲル精製を行い、MpDES6遺伝子の発現カセットを含むプラスミド (p35S-MpDES6) のPstIサイトにクローニングした。
- [0176] (iv) 上記で得られた、MpDES5及びMpDES6遺伝子の発現カセットを連結させたコンストラクト (p35S-MpDES5/35S-MpDES6と表記する) に、さらにMpELO1遺伝子の発現カセットを連結した。以下のプライマーを用いてp35S-MpELO1を鋳型としてPCRを行い、MpELO1遺伝子の発現カセット部分を増幅し、MpDES6遺伝子発現カセット内のNOSターミネーター3'末端にあるEcoRIサイトにクローニングした。  
(MpELO1 遺伝子発現カセット増幅用プライマー)  
35S-F3-EI: 5' - CCGGAATTCGCATGCCTGCAGGTCCCCAGA-3' (配列番号35)  
M13F: 5' - TGTAACACGACGGCCAGT-3' (配列番号36)
- [0177] なお、35S-F3-EIプライマーは、下線で示すEcoRI認識配列を含み、CaMV35Sプロモーターの5'末端にアニールする。また、M13FプライマーはNOSターミネーター下流のベクター配列にアニールする。
- [0178] PCRにはPyrobest DNA polymerase (Takara社製) 0.5Uを用い、製造者の推奨する方法に従って、反応液量20  $\mu$  lで行った。反応条件は、94°Cで2分間保持後、94°Cで1分間、57°Cで1分間、72°Cで1分間の反応を25回繰り返し、その後4°Cに冷却した。得られたDNA断片をEcoRIで消化した後、実施例1に記載の方法でゲル精製を行い、MpDES5及びMpDES6遺伝子の発現カセットを連結させたコンストラクト (p35S-MpDES5/35S-MpDES6) のEcoRI部位にクローニングした。
- [0179] 以上の操作により、3遺伝子の発現カセットが、MpDES5, MpDES6, MpELO1の順で連結した発現コンストラクト (p35S-MpDES5/35S-MpDES6/p35S-MpELO1) を作製した。
- [0180] このようにして得られた上記コンストラクトを、公知の方法 (Genes Genet. Syst. 73,

p219, 1998)で、ビアラフォスを選抜マーカーとして持つプラスミドとともに、パーティクルガンでイネに導入し、形質転換イネを取得した。

[0181] [実施例7:タバコ (*N. tabacum* SR-1)におけるゼニゴケ高度不飽和脂肪酸合成系の再構成]

本実施例では、上述のゼニゴケ由来の不飽和脂肪酸合成酵素遺伝子、すなわち、MpDES6遺伝子、MpDES5遺伝子、およびMpELO遺伝子が、植物体中で良好に機能することを確認した。

[0182] 具体的には、タバコにMpDES6遺伝子、MpDES5遺伝子、およびMpELO遺伝子を導入し、このタバコ中でアラキドン酸等が生産されることを確認した。比較対照として、糸状菌 (*M. alpina*) 由来の  $\Delta 6$  不飽和化酵素遺伝子 (MaDES6)、 $\Delta 5$  不飽和化酵素遺伝子 (MaDES5)、 $\Delta 6$  脂肪酸鎖長延長酵素 (MaELO) の3遺伝子を導入したタバコを作製した。

[0183] (i)糸状菌由来遺伝子を含むベクター (pSPB1519) の構築

pE2113 (Mitsuhara et al. Plant Cell Physiol. 37, 45-59 1996) は、エンハンサー配列の繰り返しを有するカリフラワーモザイクウイルス35S (E1235S) プロモーター、および、ノパリンシンターゼ (nos) ターミネーターを有する。

[0184] pE2113をSnaBIで消化した後、XhoIリンカー (TAKARA社) と連結することで、プラスミドを作製した。このプラスミドをSacIで消化後、平滑末端化し、さらにBamHIリンカー (TAKARA社) と連結することによって、pUE7を作製した。pUE7をHindIIIとEcoRIで消化することによって得られるDNA断片のうちE1235Sプロモーターを有する断片と、HindIIIとEcoRIで消化した植物形質転換用バイナリーベクターpBINPLUS (van Engelen et al. Transgenic research 4, p288, 1995) とを連結することで、pSPB505を作製した。

[0185] 一方、MaDES6遺伝子を含むプラスミドであるpMLD101をXhoIで消化後、さらにBamHIで部分消化することで、約1.6kbのDNA断片を得た。この断片と、pSPB505をXhoIとBamHIで消化して得られるバイナリーベクター部分のDNA断片とを連結することで、pSPB559を作製した。

[0186] pUCAP (van Engelen et al. Transgenic research 4, p288, 1995) をAscIで消化し

た後平滑末端化し、PacIリンカーと連結することで、pUCAPPを作製した。

- [0187] pE2113をSnaBIで消化した後、BamHIリンカー(TAKARA社)と連結することで、pUE6を作製した。pUE6をSacIで消化した後、平滑末端化し、SalIリンカー(TAKARA社)と連結することで、pUE8を作製した。pUE8をHindIIIおよびEcoRIで消化して得られるDNA断片のうちE1235Sプロモーターを有する断片を、pUCAPPのHindIII-EcoRI間に挿入することで、プラスミドを作製した。このプラスミドをBamHIとSalIで消化して得られたDNA断片と、MaELO遺伝子のcDNAをBamHIおよびXhoIで消化して得られたDNA断片とを連結し、pSPB1130を作製した。pSPB1130をPacIで消化し、得られる約2.3kbのDNA断片を、pBINPLUSのPacIサイトに挿入した。MaELO遺伝子の転写方向と、pBINPLUS上のnptII遺伝子の転写方向とが、同じ向きになっているプラスミドを選択し、そのプラスミドをpSPB1157Pとした。
- [0188] また、上述したpSPB559をPacIで消化した後、平滑末端化し、AscIリンカーと連結することで、pSPB559Aを作製した。そして、pSPB559AをAscIで消化して得られるMaDES6遺伝子を含むDNA断片を、pSPB1157PのAscIサイトに挿入することで、pSPB1157を作製した。
- [0189] pCGP1364(Plant Cell Physiol. 36, 1023, 1995)をHindIIIおよびSacIIで消化して得られる約1.3kbのDNA断片と、pCGP1364をPstIで消化し、平滑末端化した後さらにSacIIで消化して得られる約2.9kbのDNA断片と、pUCAPAをSacIで消化し、平滑末端化した後さらにHindIIIで消化して得られる約2.7kbのDNA断片とを連結することにより、pSPB184を得た。
- [0190] 一方、MaDES5遺伝子がサブクローニングされたpCRIIベクターから、XbaIとKpnIによる消化によってMaDES5遺伝子を含むDNA断片を切り出した。このDNA断片と、上述のpSPB184をXbaIとKpnIで消化して得られたDNA断片とを連結することで、pSPB1519Aを作製した。pSPB1519AをAscIで消化し、得られたDNA断片をpSPB1157のAscIサイトに挿入し、pSPB1519を作製した。このpSPB1519上で、MaDES6遺伝子、MaDES5遺伝子、およびMaELO遺伝子は、同じ向きに転写され、同じ構成的プロモーターの制御下にある。

[0191] (ii)ゼニゴケ由来遺伝子のベクター(pSPB2368)の構築

pUCAP (van Engelen et al. Transgenic Research 4, 288-290, 1995)をAscIで消化した後SgfIリンカーと連結し、さらに、PacIで消化した後FseIリンカーと連結することで、pUCSAPFを作製した。また、pBINPLUSにも同様の処理を施し、pBINSAPFを作製した。

[0192] 他にサブクローニング用のベクターとして、pUC19をHindIIIで消化した後、PacIリンカーと連結し、さらにEcoRIで消化した後FseIリンカーと連結することで、pUCPFを作製した。また、pUC19をHindIIIで消化した後SgfIリンカーと連結し、さらに、EcoRIで消化した後AscIリンカーと連結することで、pUCSAを作製した。pUCSAPFのHindIII-XbaI間にEl235Sを、SacI-EcoRI間にマノピン合成酵素(mas)遺伝子ターミネーターをそれぞれ挿入したベクターを、XbaIおよびSacIで消化した後、末端を平滑化することで、pSPB2353Aを得た。pSPB2353Aの平滑末端に、p35S-MpDES6からXbaIで切り出して末端を平滑化したMaDES6遺伝子を含むDNA断片を連結し、pSPB2353を作製した。

[0193] pUCSAのHindIII-XbaI間にEl235Sを、SacI-EcoRI間にマノピン合成酵素(mas)遺伝子ターミネーターをそれぞれ挿入したベクターを、XbaI、SacIで消化することで、pSPB2355Aを作製した。

[0194] 一方、p35S-MpELO1を鋳型として、下記のプライマー、XbaMpELOfおよびSacMpELOrを用いてPCRを行った。

XbaMpELOf: 5'-AGTCTCTAGAGCGATGGAGGCGTACG-3' (配列番号43)

SacMpELOr: 5'-CAGTGAGCTCGGTGTCTTATTCTGCC-3' (配列番号44)

[0195] PCRには、酵素として高精度なKOD+DNAポリメラーゼ(東洋紡)を用い、94℃で2分間保持した後、94℃で15秒、68℃で1-3分のサイクルを25回繰り返した。このようにして調製されたMpELODNA断片をXbaIおよびSacIで消化したものを、上述のpSPB2355Aに連結し、pSPB2355を作製した。さらに、pSPB2355をSgfI、AscIで消化して得られたDNA断片を、SgfIおよびAscIで消化したpSPB2353に連結し、pSPB2361を作製した。

[0196] pUCPFのHindIII-XbaIサイトにEl235Sを、SacI-EcoRIサイトにマノピン合成

酵素 (mas) 遺伝子ターミネーターをそれぞれ挿入したベクターを、XbaIおよびSacIで消化することで、pSPB2352Aを作製した。

- [0197] 一方、p35S-MpDES5を鋳型に、下記のプライマー、XbaMpD5fおよびSacMpD5rを用いてPCRを行った。PCRの反応条件は、上記のPCR条件と同様である。

XbaMpD5f: 5'-AGCTTCTAGAGCCATGCCGCCACACGCCC-3' (配列番号45)

SacMpD5r: 5'-CAGTGAGCTCTCAGCCATCCAGTCGT-3' (配列番号46)

- [0198] PCRによって調製されたMpD5DNA断片をXbaI、SacIで消化したものを、pSPB2352Aに連結し、pSPB2352を作製した。

- [0199] pBINSAPFをPacIおよびFseIで消化して得られたDNA断片に、pSPB2352よりPacIおよびFseIで切り出したMpDES5遺伝子を含むDNA断片を連結し、pSPB2368Aを作製した。さらにpSPB2368AをSgfIおよびPacIで消化したものに、pSPB2361よりSgfIおよびPacIで切り出されたMpDES6遺伝子およびMpELO遺伝子を含むDNA断片を連結することで、pSPB2368を得た。このプラスミド上でMpDES6遺伝子、MpDES5遺伝子、およびMpELO遺伝子は、同じ向きに転写され、同じ構成的プロモーターの制御下にある。

- [0200] (iii) タバコへの遺伝子導入

引き続き、公知の方法 (Plant J. 5, 81, 1994) に基づいて、pSPB2368またはpSPB1519を用いて *Agrobacterium tumefaciens* (菌株: Agl0 (Lazo et al. 1991, Biotechnology9:963-967)) を形質転換した。このpSPB2368またはpSPB1519を有する形質転換体アグロバクテリウムを、タバコリーフディスクに感染させた。このようにして得られた組換えタバコの葉から、RNeasyPlantminiKit (キアゲン) を用いてRNAを抽出し、定法に従って、RT-PCRにより、導入した遺伝子が発現している系統を選択した。

- [0201] このようにして得られた糸状菌由来の酵素遺伝子から成るpSPB1519を導入したタバコ (pSPB1519形質転換タバコ)、ゼニゴケ由来の酵素遺伝子から成るpSPB2368を導入したタバコ (pSPB2368形質転換タバコ) の葉から、公知の方法 (藤野安彦編 (1978) 生物化学実験法9 学会出版センター、山田晃弘編 (1989) 生物化学実験法24 学会出版センター) にしたがって、脂質の抽出を行った。得られた脂質を

ガスクロマトグラフィー (Hewlett Packard社 HP-6800) で分析し、その結果を表1に示す。

[0202] なお、コントロールとして、遺伝子が導入されていないタバコの葉を用いて、同様の分析を行った。

[0203] [表1]

	Control (%)	Control (mg/gFW)	pSPB2368 (%)	pSPB2368 (mg/gFW)	pSPB1519 (%)
リノール酸	9.55	1.17	1.37	0.2	9.51
$\alpha$ リノレン酸	49.99	6.12	17.83	2.58	39.24
$\gamma$ リノレン酸	0	0	4.06	0.59	3.37
ジホモ $\gamma$ リノレン酸	0	0	10.85	1.57	3.09
アラキドン酸	0	0	10.27	1.49	0
エイコサテトラエン酸	0	0	4.89	0.71	0
エイコサペンタエン酸	0	0	2.68	0.39	0
全脂質量	-	12.25	-	14.48	-

[0204] 本実施例のガスクロマトグラフィーによる分析条件を以下に示す。

(ガスクロマトグラフィー分析条件)

カラム: Supelco SP-2330、Fused Silica Capillary Column、30m x 0.32 mm ID、0.2  $\mu$  m

温度: Inj: 240°C、Det: 250°C、Oven: 180°C 3分、180°C→220°C (2°C/min)

カラム流量: 30cm/sec、圧力200 kPa、検出器 FID

[0205] クロマトグラム中の各ピークは標準脂肪酸のメチルエステルのリテンションタイムとGC-MASS (Hewlett Packard社、HP-5973) 分析により決定し、またピーク面積より各脂肪酸の割合を決定した。

[0206] 表1において、Controlはコントロールを、pSPB2368はpSPB2368形質転換タバコを、pSPB1519はpSPB1519形質転換タバコを表す。

[0207] 表1に示す結果から、糸状菌由来の酵素遺伝子から成るpSPB1519を導入したタバコ (pSPB1519形質転換タバコ) では、ジホモ $\gamma$  リノレン酸の蓄積は確認できたが、アラキドン酸の蓄積は認められなかった。一方、ゼニゴケ由来の酵素遺伝子から成る

pSPB2368を導入したタバコ(pSPB2368形質転換タバコ)ではアラキドン酸だけでなく、エイコサテトラエン酸およびエイコサペンタエン酸の蓄積も確認できた。このことから、高等植物においては、糸状菌由来の酵素よりもゼニゴケ由来の酵素の方が機能的に優れており、リノール酸や $\alpha$ リノレン酸を基質として、アラキドン酸を始めとする高度不飽和脂肪酸を合成できると考えられた。

- [0208] Abbadiらは、ケイソウ(*Phaeodactylum tricornutum*)の $\Delta 6$ 不飽和化酵素、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素、およびヒメツリガネゴケ(*Physcomitrella patens*)の鎖長延長酵素の遺伝子を、タバコおよびアマ(*Linum usitatissimum*)に導入することで、アラキドン酸を、タバコの種子に1.5%、アマの種子に1.0%蓄積させたことを報告している(Amine Abbadi et al. *Plant Cell* 16, 2734-2748, 2004)。
- [0209] 本実施例においては、ゼニゴケ由来の $\Delta 6$ 不飽和化酵素、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素および鎖長延長酵素をタバコに導入したことで、タバコの葉にアラキドン酸を10%以上蓄積させている。この結果から、本実施例のpSPB2368形質転換タバコは、上述の報告と比較しても、より効率的に高度不飽和脂肪酸を合成できる能力があることが示唆された。
- [0210] また、ハプト藻(*Isochrysis galbana*)の $\Delta 9$ 鎖長延長酵素、ミドリムシ(*Engelmannia gracilis*)の $\Delta 8$ 不飽和化酵素、糸状菌の $\Delta 5$ 不飽和化酵素の3種類の遺伝子を用いて、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)で脂質の改変を行った報告では、葉中でアラキドン酸が総脂質に対して6.6mol%、C20以上の脂質が22.5mol%であった(Baoxiu Qi et al. *Nature Biotechnology* 22, 739-745, 2004)。この報告では、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素、および鎖長延長酵素を用いる経路とは別の修飾経路で高度不飽和脂肪酸を作っており、単純比較は出来ないが、ゼニゴケの酵素を用いたほうがより多くの高度不飽和脂肪酸を蓄積することがわかった。
- [0211] 総脂質の30%以上が改変脂肪酸になっているpSPB2368形質転換タバコでは、形態的な異常は見られなかった。さらに、稔性にも問題なく、多くの種子をつけたことから、異所的な高度不飽和脂肪酸の増加が植物の生育に及ぼす影響は少ないと考えられた。
- [0212] これまでに報告されている遺伝子組換え植物におけるC20以上の高度不飽和脂肪

酸の生産は総脂質の20%前後、アラキドン酸に限ると6%前後が限界である。しかし、本実施例のように、ゼニゴケ由来の脂肪酸合成酵素を用いることにより、この限界を打ち破り、より多くの高度不飽和脂肪酸を植物で生産することが出来ると考えられる。

[0213] 尚、発明を実施するための最良の形態の項においてなした具体的な実施態様または実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、本発明の精神と次に記載する特許請求の範囲内で、いろいろと変更して実施することができるものである。

#### 産業上の利用の可能性

[0214] 本発明に係る遺伝子は、同一種のゼニゴケから単離された $\Delta 5$ 不飽和化酵素遺伝子、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子及び $\Delta 6$ 鎖長延長酵素遺伝子である。したがって、これら3種類の遺伝子を植物内で同時に発現させた場合に、異なる生物種由来の複数の遺伝子を発現させるより、植物内で良好に機能するという効果を奏する。さらに、ゼニゴケは、高等植物のモデル系と考えられるため、これらの遺伝子は、植物以外の生物種由来の遺伝子より植物内で良好に機能することができるという効果を奏する。

[0215] また、本発明に係る形質転換体は、アラキドン酸やエイコサペンタエン酸(EPA)等の高度不飽和脂肪酸を生産することができるという効果を奏する。特に、本発明に係る形質転換植物は、低コストかつ環境にやさしい生産プロセスでアラキドン酸やEPA等の高度不飽和脂肪酸を生産することができるという効果を奏する。こうして得られたアラキドン酸やEPAは、安価な多目的材料として活用できるという効果を奏する。さらに、上記形質転換植物体を食料として用いた場合、アラキドン酸やEPAの含量が高い食料としての価値が高まるという効果を奏する。

[0216] 以上のように、本発明の遺伝子・たんぱく質は、アラキドン酸やEPAの生産に有用である。また、本発明の遺伝子を発現可能に導入した形質転換体は、製薬産業、食品産業、各種素材産業等において、アラキドン酸やEPAを生産するうえで、極めて有用である。また、特に、上記形質転換体が植物体である場合、植物体内のアラキドン酸やEPAの含量が増加するので、農業分野等において非常に有用である。



## 請求の範囲

- [1] 配列番号1に示される塩基配列からなるDNAの全部又は一部、あるいは当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAの全部又は一部とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化活性を有するたんぱく質をコードするゼニゴケ目生物由来の遺伝子。
- [2]  $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記(a)又は(b)に記載の遺伝子。
- (a) 配列番号1に示される塩基配列を有する遺伝子。
- (b) 配列番号1に示される塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。
- [3]  $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記(a)又は(b)に記載の遺伝子。
- (a) 配列番号1に示される塩基配列のうち、253ないし1698番目の塩基配列を有する遺伝子。
- (b) 配列番号1に示される塩基配列のうち、253ないし1698番目の塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。
- [4]  $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記(a)又は(b)に記載の遺伝子。
- (a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。
- (b) 配列番号2に示されるアミノ酸配列の1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。
- [5] 配列番号3に示される塩基配列からなるDNAの全部又は一部、あるいは当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAの全部又は一部とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ $\Delta 6$ 脂肪酸鎖長延長活性を有するたんぱく質をコードするゼニゴケ目生物由来の遺伝子。
- [6]  $\Delta 6$ 脂肪酸鎖長延長活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記(a)又は(b)に記載の遺伝子。

- (a) 配列番号3に示される塩基配列を有する遺伝子。
- (b) 配列番号3に示される塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。
- [7]  $\Delta$ 6脂肪酸鎖長延長活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記(a)又は(b)に記載の遺伝子。
- (a) 配列番号1に示される塩基配列のうち、194ないし1066番目の塩基配列を有する遺伝子。
- (b) 配列番号1に示される塩基配列のうち、194ないし1066番目の塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。
- [8]  $\Delta$ 6脂肪酸鎖長延長活性を有するゼニゴケ目由来のたんぱく質をコードする、下記(a)又は(b)に記載の遺伝子。
- (a) 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質、
- (b) 配列番号4に示されるアミノ酸配列の1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。
- [9] 配列番号5に示される塩基配列からなるDNAの全部又は一部、あるいは当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAの全部又は一部とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ $\Delta$ 5脂肪酸不飽和化活性を有するたんぱく質をコードするゼニゴケ目生物由来の遺伝子。
- [10]  $\Delta$ 5脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記(a)又は(b)に記載の遺伝子。
- (a) 配列番号5に示される塩基配列を有する遺伝子。
- (b) 配列番号5に示す塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。
- [11]  $\Delta$ 5脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記(a)又は(b)に記載の遺伝子。
- (a) 配列番号5に示される塩基配列のうち、375ないし1829番目の塩基配列を有する遺伝子。

(b) 配列番号5に示される塩基配列のうち、375ないし1829番目の塩基配列からなるDNA、又は当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子。

- [12]  $\Delta$ 5脂肪酸不飽和化活性を有するゼニゴケ目生物由来のたんぱく質をコードする、下記(a)又は(b)に記載の遺伝子。

(a) 配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。

(b) 配列番号6に示されるアミノ酸配列の1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるたんぱく質をコードする遺伝子。

- [13] 請求項1～12の何れか1項に記載の遺伝子によってコードされるたんぱく質。

- [14] 以下の(a)又は(b)記載のたんぱく質。

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質。

(b) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、 $\Delta$ 6脂肪酸不飽和化活性を有するたんぱく質。

- [15] 以下の(a)又は(b)記載のたんぱく質。

(a) 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質。

(b) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、 $\Delta$ 6脂肪酸鎖長延長活性を有するたんぱく質。

- [16] 以下の(a)又は(b)記載のたんぱく質。

(a) 配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるたんぱく質。

(b) 配列番号6に示されるアミノ酸配列において、1個又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、 $\Delta$ 5脂肪酸不飽和化活性を有するたんぱく質。

- [17] 請求項13～16の何れか1項に記載のたんぱく質を認識する抗体。

- [18] 少なくとも請求項1～12の何れか1項に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。

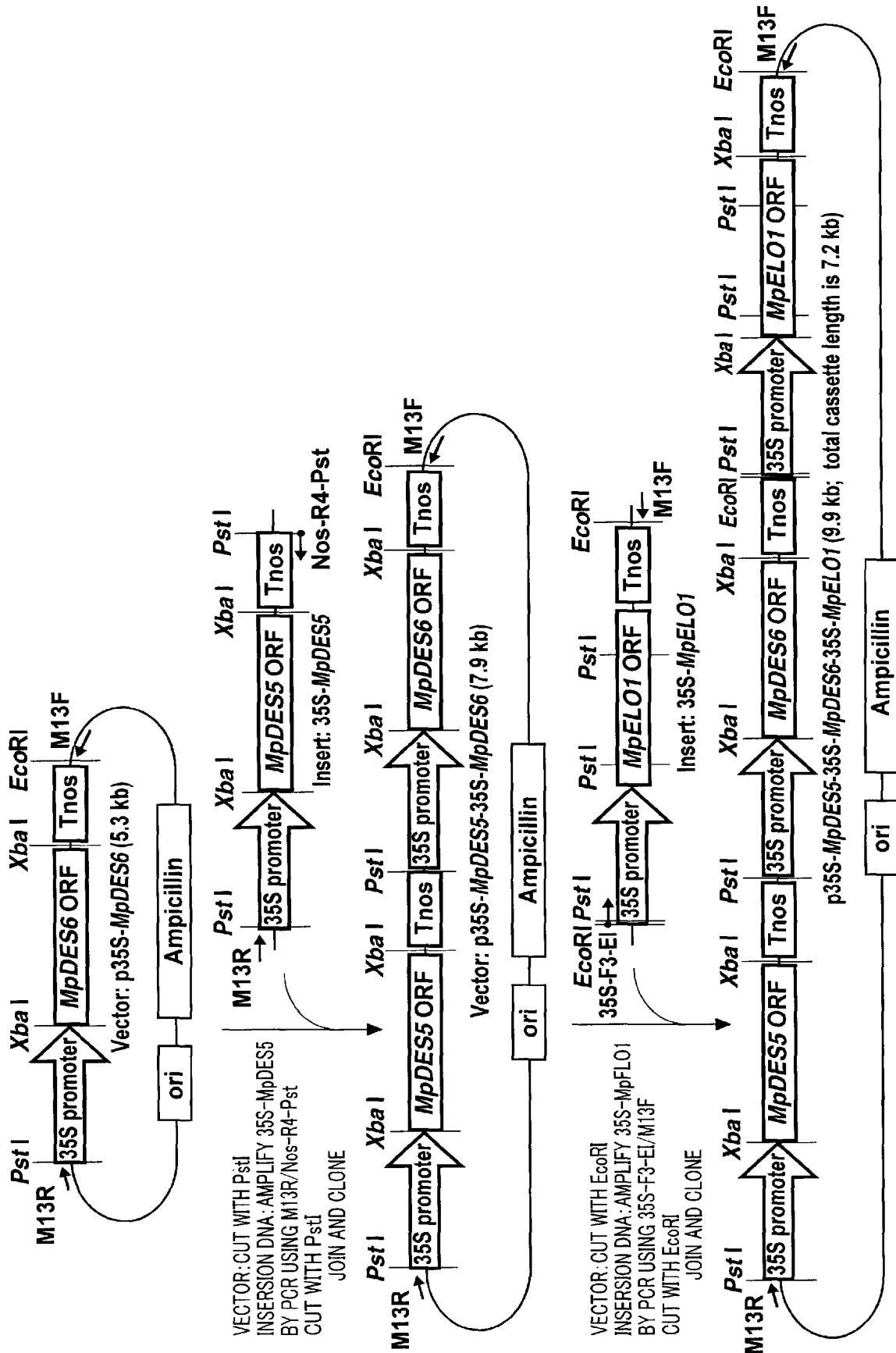
- [19] 少なくとも請求項1～12の何れか1項に記載の遺伝子を導入してなる形質転換体。

- [20] 少なくとも請求項1～12の何れか1項に記載の遺伝子が発現可能に導入された植

物体、もしくは当該植物体と同一の性質を有する当該植物体の子孫となる植物体、又は当該植物体の組織。

- [21] 少なくとも請求項1〜12の何れか1項に記載の遺伝子が発現可能に導入され、脂肪酸組成が改変された植物体、もしくは当該植物体と同一の性質を有する当該植物体の子孫となる植物体、又は当該植物体の組織。
- [22] 請求項20又は21に記載の植物体の繁殖材料。
- [23] 請求項21に記載の植物体又は植物体の組織を用いることを特徴とする脂肪酸生産方法。
- [24] 請求項23に記載の脂肪酸生産方法により得られた、 $\gamma$ -リノレン酸、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸、アラキドン酸、ステアリドン酸、エイコサテトラエン酸、およびエイコサペンタエン酸から選択される少なくとも1つ含む素材。
- [25] 少なくとも請求項1〜12の何れか1項に記載の遺伝子を用いて脂肪酸組成を改変する方法。
- [26] 請求項1〜12の何れか1項に記載の遺伝子における少なくとも一部の塩基配列又はその相補配列をプローブとして用いた遺伝子検出器具。
- [27] 請求項13〜16の何れか1項に記載のたんぱく質を用いて、当該たんぱく質を調節する遺伝子、又は当該たんぱく質を調節する物質をスクリーニングする方法。
- [28] 請求項27に記載のスクリーニング方法により得られた遺伝子又は物質。

[ 1 ]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019196

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/29, 1/15, 1/19, 1/21, 5/14, 9/02, 9/10, C07K16/16,  
C12Q1/68, A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/29, 1/15, 1/19, 1/21, 5/14, 9/02, 9/10, C07K16/16,  
C12Q1/68, A01H5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PIR/SwissProt/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Girke T. et al., Identification of a novel delta 6-acyl-group desaturase by targeted gene disruption in <i>Physcomitrella patens</i> ., Plant.J., 1998, 15(1), pages 39 to 48	14,17,24, 26-27/ 1-13,15-16, 18-23,25
X/A	Sperling P. et al., A bifunctional delta-fatty acyl acetylenase/desaturase from the moss <i>Ceratodon purpureus</i> ., A new member of the cytochrome b5 superfamily., Eur.J.Biochem., 2000, 267(12), p.3801-11	14,17,24, 26-27/ 1-13,15-16, 18-23,25
X/A	JP 2003-509050 A (Celanese Ventures GmbH.), 11 March, 2003 (11.03.03), Particularly, Sequence Nos. 1 to 2 & WO 01/20000 A1 & EP 1214418 A	14,17,24, 26-27/ 1-13,15-16, 18-23,25



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
24 March, 2005 (24.03.05)

Date of mailing of the international search report  
12 April, 2005 (12.04.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019196

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 2003-523746 A (BASF AG.), 12 August, 2003 (12.08.03), Particularly, sequence Nos. 1 to 2 & US 2004/0111763 A1 & EP 125438 A & WO 01/59128 A2	15,17,24, 26-27/ 1-14,16, 18-23,25
X/A	Michaelson L.V. et al., Isolation of a Delta5-fatty acid desaturase gene from Mortierella alpina.J.Biol.Chem., 1998, 273(30), p.19055-9	16-17,24, 26-27/ 1-15,18-23, 25
A	Chiou SY. et al., Optimizing production of polyunsaturated fatty acids in Marchantia polymorpha cell suspension culture., J. Biotechnol., 2001, 85(3), p.247-57	1-27
A	Shinmen Y., et al., Production of arachidonic- acid and eicosapentaenoic acids by marchantia- polymorpha in cell-culture., Phytochemistry, 1991, 30(10), pages 3255 to 3260	1-27
P,X	KAJIKAWA M. et al., Isolation and characterization of delta(6)-desaturase, an ELO-like enzyme and delta (5)-desaturase from the liverwort Marchantia polymorpha and production of arachidonic and eicosapentaenoic acids in the methylotrophic yeast Pichia pastoris., Plant.Mol.Biol., 2004, February, 54(3), p.335-52	1-27

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/019196

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 28  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
See extra sheet.
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
See extra sheet.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.



Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

<Subject of search>

(Claim 28)

Concerning the expression "a gene or a substance obtained by a screening method as claimed in claim 27" in claim 28, the scope of genes or substances having such a property cannot be specified even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration. Namely, claim 28 is described in an extremely unclear manner and, therefore, does not comply with the requirement of clearness in the meaning within PCT Article 6.

Such being the case, no meaningful search can be made on the invention according to claim 28.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

<Unity of invention>

Claims of the present case are divided into the following invention groups.

(1) A gene originating in a plant of *Marchantiales* which encodes a protein encoded by DNA having the base sequence represented by SEQ ID NO:1 according to the present case and having a  $\Delta 6$  fatty acid desaturation activity, and substances relating thereto (claims 1 to 4 and 14 and the parts of claims 13 and 17 to 28 relating to a gene encoding a protein having the  $\Delta 6$  fatty acid desaturation activity).

(2) A gene originating in a plant of *Marchantiales* which encodes a protein encoded by DNA having the base sequence represented by SEQ ID NO:3 according to the present case and having a  $\Delta 6$  fatty acid chain-elongation activity, and substances relating thereto (claims 5 to 8 and 15 and the parts of claims 13 and 17 to 28 relating to a gene encoding a protein having the  $\Delta 6$  fatty acid chain-elongation activity).

(3) A gene originating in a plant of *Marchantiales* which encodes a protein encoded by DNA having the base sequence represented by SEQ ID NO:5 according to the present case and having a  $\Delta 5$  fatty acid desaturation activity, and substances relating thereto (claims 9 to 12 and 16 and the parts of claims 13 and 17 to 28 relating to a gene encoding a protein having the  $\Delta 5$  fatty acid desaturation activity).

To regard that a plural number of genes have the same or corresponding special technical features, it is generally necessary that all of these genes have a common property or activity and, moreover, an important structural factor in common essentially required in the common property or activity.

The three genes (SEQ ID NOS:1, 3 and 5) relating to the above invention groups of the present case are in common exclusively in being obtained from an organism belonging to *Marchantiales*. Namely, they have different activities from each other, are less homogeneous and have no important structural factor in common.

Thus, there is no common matter among these three invention groups as described above seemingly being a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2 and no technical relevancy can be found out among these inventions differing from each other in the meaning within PCT Rule 13.

Such being the case, the above invention groups do not comply with the requirement of unity of invention.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/29, 1/15, 1/19, 1/21, 5/14, 9/02, 9/10, C07K16/16, C12Q1/68, A01H5/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/29, 1/15, 1/19, 1/21, 5/14, 9/02, 9/10, C07K16/16, C12Q1/68, A01H5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PIR/SwissProt/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	Girke T. et al., Identification of a novel delta 6-acyl-group desaturase by targeted gene disruption in <i>Physcomitrella patens</i> . Plant J., 1998, 15(1), p. 39-48	14, 17, 24, 26-27 /1-13, 15-16, 18-23, 25
X/A	Sperling P. et al., A bifunctional delta-fatty acyl acetylenase/desaturase from the moss <i>Ceratodon purpureus</i> . A new member of the cytochrome b5 superfamily. Eur. J. Biochem., 2000, 267(12), p. 3801-11	14, 17, 24, 26-27 /1-13, 15-16, 18-23, 25

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 03. 2005

国際調査報告の発送日

12. 4. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4 B

3 1 3 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	JP 2003-509050 A(セラニーズ ベンチャーズ ゲー・エム・ベー・ ハー) 2003. 03. 11 特に、配列番号1-2参照 & WO 01/20000 A1 & EP 1214418 A	14, 17, 24, 26- 27 /1-13, 15-16, 18-23, 25
X/A	JP 2003-523746 A(ビーエーエスエフ アクチェンゲゼルシャフト) 2003. 08. 12 特に、配列番号1-2参照 & US2004/0111763 A1 & EP 1254238 A & WO 01/59128 A2	15, 17, 24, 26- 27 /1-14, 16, 18- 23, 25
X/A	Michaelson L. V. et al., Isolation of a Delta5-fatty acid desaturase gene from Mortierella alpina. J. Biol. Chem., 1998, 273 (30), p. 19055-9	16-17, 24, 26- 27 /1-15, 18-23, 25
A	Chiou SY. et al., Optimizing production of polyunsaturated fatty acids in Marchantia polymorpha cell suspension culture. J. Biotechnol., 2001, 85 (3), p. 247-57	1-27
A	Shinmen Y. et al., Production of arachidonic-acid and eicosapentaenoic acids by marchantia-polymorpha in cell-culture. Phytochemistry, 1991, 30 (10), p. 3255-3260	1-27
PX	Kajikawa M. et al., Isolation and characterization of delta(6) -desaturase, an ELO-like enzyme and delta(5)-desaturase from the liverwort Marchantia polymorpha and production of arachidonic and eicosapentaenoic acids in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Plant Mol. Biol., 2004 Feb, 54 (3), p. 335-52	1-27

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2. ☒ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ 28 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
特別ページ参照。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。  
特別ページ参照。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## &lt;調査の対象について&gt;

## (請求の範囲28について)

請求の範囲28の「請求項27に記載のスクリーニング方法により得られた遺伝子又は物質」なる記載は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する遺伝子又は物質の範囲を特定できないから、請求の範囲28は著しく不明確であり、PCT6条における明確性の要件を欠いている。

したがって、請求の範囲28に係る発明について有意義な調査をすることができない。

## &lt;発明の単一性について&gt;

請求項は次の発明群に分けられる。

- ①本願配列番号1に示される塩基配列からなるDNAによってコードされる、 $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化活性を有する蛋白質をコードするゼニゴケ目生物由来の遺伝子およびそれに係るもの（請求の範囲1-4, 14、および請求の範囲13, 17-28のうち、該 $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化活性を有する蛋白質をコードする遺伝子に係る部分）
- ②本願配列番号3に示される塩基配列からなるDNAによってコードされる、 $\Delta 6$ 脂肪酸鎖長延長活性を有する蛋白質をコードするゼニゴケ目生物由来の遺伝子およびそれに係るもの（請求の範囲5-8, 15、および請求の範囲13, 17-28のうち、該 $\Delta 6$ 脂肪酸鎖長延長活性を有する蛋白質をコードする遺伝子に係る部分）
- ③本願配列番号5に示される塩基配列からなるDNAによってコードされる、 $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化活性を有する蛋白質をコードするゼニゴケ目生物由来の遺伝子およびそれに係るもの（請求の範囲9-12, 16、および請求の範囲13, 17-28のうち、該 $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化活性を有する蛋白質をコードする遺伝子に係る部分）

一般に、複数の遺伝子が同一の又は対応する特別な技術的特徴を有するには、該複数の遺伝子の全てが、共通の性質又は活性を有し、かつ、その共通の性質又は活性に不可欠である重要な構造要素を共有していることが必要である。

しかし、上記本願発明群に係る3つの遺伝子（配列番号1, 3, 5）は、ゼニゴケ目生物から得られるという点でのみ共通するものの、互いに異なる活性を有し、かつ、相同性が低く、共通の重要な構造要素も共有していない。

それ故、上記3発明群にPCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる共通の事項は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。

よって、上記発明群は単一性の要件を満たしていない。